

**Nichtkompetitive Inhibition der tRNA-Guanin
Transglycosylase durch Störung der essentiellen
Protein-Protein-Interaktion**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Stephan Jakobi, geb. Barth

aus

Görlitz

Marburg/Lahn 2013

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 27.06.2013 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerhard Klebe
Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Reuter

Tag der mündlichen Prüfung am 28.06.2013.

*..., doch die Sucht etwas Neues zu sehn, trieb mich
vorwärts.*

Ludwig Tieck, Der Blonde Eckbert

Inhaltsverzeichnis

1	Zur Einleitung	1
1.1	Protein-Protein-Interaktionen als „neue“ Zielstrukturen der Wirkstoffentwicklung	1
1.2	tRNA-Guanin Transglycosylase in der Pathogenität der Shigellenruhr .	3
1.3	Motivation und Aufgabenstellung der Arbeit	8
2	Methodik	11
2.1	Computermethoden	11
2.2	Experimentelle Methoden	13
3	Ergebnisse und Diskussion	31
3.1	Charakterisierung des Dimer- <i>Interface</i>	31
3.2	Auswahl und <i>in silico</i> Validierung verschiedener <i>Interface</i> Mutanten . .	44
3.3	Destabilisierung des Dimer- <i>Interface</i> : TGT W326E/E339Q	49
3.4	Diskussion I: Identifikation treibender Kräfte der TGT Dimerisierung .	71
3.5	Destabilisierung eines aromatischen Clusters: TGT F92C/C158S/C281S, TGT Y330C, TGT Y330D	76
3.6	Diskussion II: Konformative Freiheiten des TGT Monomers in Lösung .	94
3.7	Ansätze zur Entwicklung eines PPI-Liganden mittels <i>in silico</i> unterstützten, kovalenten <i>Tetherings</i>	102
3.8	Diskussion III: A long way ‚reaching for high-hanging fruit‘ ^[1]	122
4	Zusammenschau und Ausblick	127
A	Nukleotidsequenz des TGT Wildtyp ZM10	I
B	Massenspektren exprimierter TGT Varianten	V
C	Kristallographische Tabellen	IX

D Geometrische Auswertung der MD-Simulationen verschiedener Tether-Fragmente	XIII
E Abbildungsverzeichnis	XXV
F Tabellenverzeichnis	XXVII
G Literaturverzeichnis	XXIX

1 Zur Einleitung

1.1 Protein-Protein-Interaktionen als „neue“ Zielstrukturen der Wirkstoffentwicklung

Die Entwicklung neuer Wirkstoffe stellt das Hauptaugenmerk der modernen Pharmazie und medizinischen Chemie dar. Die daraus resultierenden Therapeutika greifen *in vivo* in zelluläre Funktionen ein, die zumeist nicht durch isolierte Faktoren, sondern durch das Zusammenspiel von Multiproteinkomplexen gesteuert werden. Diese Form der natürlichen Prozesssteuerung in Zellen bietet einen Zugang zu neuen Strategien für die gezielte Hemmung durch Inhibitoren (Antagonisten) oder die Stimulation mit einem Agonisten. Dabei wird nicht die Substratbindetasche adressiert (klassische, kompetitive Inhibitoren), sondern die Kontaktfläche der am Komplex beteiligten Proteine (Protein-Protein-Interface, PPI). [2–6]

Für die Anwendbarkeit einer solchen, nichtkompetitiven Regulierung müssen verschiedene Randbedingungen gegeben sein, um erfolgreich in die Funktionalität eingreifen zu können. Neben den konventionellen Bedingungen wie (oralen) Bioverfügbarkeit, ausreichender Zellpermeabilität und metabolischer Stabilität im Körper, um den Wirkort zu erreichen, muss es zudem möglich sein, überhaupt in die Bindung zwischen den Polypeptidketten eingreifen zu können. Permanente Oligomere können nur in der Bildungsphase adressiert werden, Peptide transienter Komplexe ändern u.U. in der freien Variante ihre Struktur, die vor einer erfolgreichen Wirkstoffentwicklung zunächst meist aufwändig bestimmt werden muss. Außerdem sind die Kontaktflächen der beteiligten Bindungspartner im Vergleich zur Oberfläche eines Wirkstoffs in Form eines Kleinmoleküls bis 500 Da mit meist deutlich über 1000 \AA^2 derart groß, dass die Platzierung eines solchen Moleküls u.U. toleriert wird und sich der Komplex weiterhin ausbilden und seine Funktionalität behalten könnte. [1,4,7–9]

Bei der Entwicklung von PPI-Inhibitoren zeigten sich in jüngerer Vergangenheit drei mögliche Klassen: hochspezifische Antikörper, aus der Struktur des komplementären

Bindungspartners abgeleitete peptidische Inhibitoren bzw. Peptidomimetika und arzneistoffähnliche Kleinmoleküle (*drug-like inhibitors*). Die Anwendungsbreite erstreckt sich über die gesamte Vielfalt menschlicher Krankheitsbilder (Krebs ^[10,11], HIV ^[12,13], parasitäre Chagas-Krankheit und afrikanische Schlafkrankheit ^[14], Immunsuppression u.v.a.m. ^[4,15]). Im methodischen Ansatz zur Wirkstoffentwicklung mit dem Ziel der Protein-Protein-*Interfaces* findet man ebenso die gesamte Bandbreite experimenteller wie computerunterstützter Varianten (z.B. *High-Throughput-Screening* großer Bibliotheken mit biochemischen, massenspektrometrischen und spektroskopischen Methoden ^[4], *Tethering* ^[16] und andere fragmentbasierte Methoden ^[17–19], Strukturaufklärung mittels Proteinkristallographie ^[20] und NMR-Spektrometrie ^[18,21], *Docking* bzw. *Virtuell Screening* ^[22–25], Datenbankauswertungen ^[26,27], Molekulardynamiksimulation ^[21], etc.).

Bevor jedoch die Wirkstoffentwicklung in Angriff genommen werden kann, müssen bei einigen Ansätzen konkrete Informationen zur Ausprägung des PPI erlangt werden. Diese umfassende Charakterisierung zielt darauf ab, einen geeigneten Bindebereich auf der Oberfläche des monomeren Proteins zu adressieren, um die Affinität der Polypeptidketten untereinander signifikant zu senken und mit der Komplexbildung konkurrieren zu können. Bei vielen Proteinkomplexen konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass eng abgegrenzte Bereiche des *Interface* überproportional zur Affinität beitragen und sogenannte *Hot-Spots* bilden. ^[28–30] Diese sind bevorzugt als Binderegionen zu sehen, sind aber nicht notwendigerweise am besten geeignet, da die Oberflächenbeschaffenheit des Proteins als zweiter wichtiger Einflussfaktor dem gegenübersteht. Häufig sind diese Bereiche eher flach ausgebildet und würden einen Liganden nur ungenügend vor Zutritt des Lösemittels schützen. ^[31] So müssen zunächst strukturbasierte und energetische Informationen durch experimentelle Studien (Alaninescan in Verbindung mit (biochemischen) Assays ^[32–34], nichtdenaturierende Massenspektrometrie ^[35–37], dynamische Lichtstreuung ^[38], Proteinkristallographie ^[39,40]), Datenbankanalyse ^[41,42] und *in silico* Berechnungen gewonnen werden. ^[3,43–47]

Eine wichtige Rolle bei der Charakterisierung von Proteinkomplexen und deren anschließenden Adressierung mit einem Liganden stellt deren innere Struktur dar: Heterooligomere sind meist einfacher zu charakterisieren, falls die einzelnen Bestandteile getrennt voneinander produziert werden können. Damit sind strukturelle Daten sowohl im monomeren als auch im oligomeren Zustand prinzipiell zugänglich, zusätzlich lässt sich der Komplexbildungsprozess *in vitro* verfolgen. Homooligomere bilden in der Regel schon bei oder kurz nach der Produktion selbstständig den Komplex aus und

können danach oft nicht mehr einfach getrennt werden, sodass Veränderungen in der Struktur zwischen Monomer und Oligomer schwer identifizierbar sind. Typischerweise sind Homooligomere funktionell obligat, d.h. sie sind nur im Komplex aktiv. Dies kann sich u.U. auch auf die Stabilität der einzelnen Polypeptidketten auswirken, die bei Monomerisierung denaturieren könnten (strukturell obligat). Heterooligomere hingegen werden häufig an verschiedenen Orten der Zelle bereitgestellt, bevor sie an anderer Stelle den Komplex ausbilden. Dieser kann permanent (dann auch funktionell obligat) oder transient (dann meist mit regulatorischem Charakter oder als Transportkomplex) ausgeprägt sein. So ergibt sich, dass transiente Heterooligomere einfach, permanente Homooligomere hingegen schwierig mit Liganden im Bereich des Protein-Protein-Interface zu adressieren sind. ^[48]

1.2 tRNA-Guanin Transglycosylase in der Pathogenität der Shigellenruhr

Shigella-Bakterien lösen nach Befall der menschlichen Darmschleimhaut Entzündungsreaktionen verbunden mit kolikartigen Schmerzen, blutigem Stuhl und starkem Durchfall aus – Symptome der Shigellenruhr. Die Krankheit ist verbreitet in Entwicklungsländern auf dem afrikanischen Kontinent, in Südamerika und Südostasien anzutreffen und kann sich überall dort epidemieartig manifestieren, wo der Zugang zu sauberem Trinkwasser durch Armut, Kriegswirren, Naturkatastrophen und die verbreitete Einrichtung großer Flüchtlingslager erschwert bis unmöglich ist. Die Übertragbarkeit ist durch eine sehr niedrige Anzahl zur Infektion benötigter Bakterien – 10 bis 100 von ihnen können ausreichend sein – in besonderem Maße begünstigt. Weltweit wurde in den 1990er Jahren von bis zu 165 Millionen Neuerkrankten jährlich berichtet ^[49,50], davon starben ca. 1.1 Millionen. Besonders Kinder unter fünf Jahren sind aufgrund ihrer schwachen körperlichen Konstitution betroffen (ca. 60% aller Todesopfer, 70% aller Infizierter). In den Industrieländern der westlichen, entwickelten Welt sind hingegen nur ein Hundertstel der Fallzahlen zu verzeichnen.

Shigella-Bakterien als Gruppe gramnegativer Stäbchenbakterien der *Enterobacteriaceae* lassen sich in vier Stränge *S.flexneri*, *S.sonnei*, *S.boydii* und *S.dysenteriae* aufteilen, wobei diese je nach Region unterschiedlich stark pathogen in Erscheinung treten (vorwiegend *S.flexneri* in Afrika, Asien und Südamerika, *S.sonnei* in den Industrieländern) und z.T. noch verschiedene Serotypen beinhalten. *S.dysenteriae* löst durch

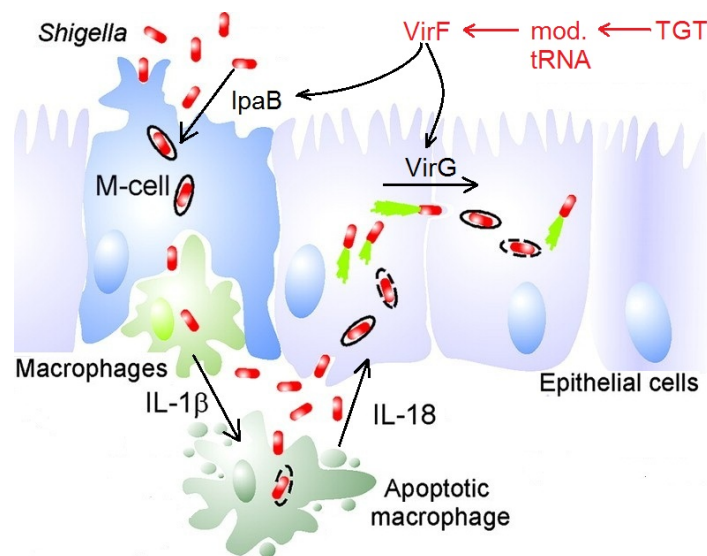


Abbildung 1.1: Invasion des Darmepithels durch *S. flexneri*. *Shigella* nutzt für die Transzytose die M-Zellen, induziert deren Apoptose und attackiert die Epithelial cells anschließend von der basolateralen Seite, um sich dann innerhalb der Darmwand von Zelle zu Zelle zu verbreiten. Die wesentlichen Virulenzfaktoren sind entsprechend angegeben. Die initiale Regulation basiert auf VirF, das von durch TGT modifizierter tRNA abhängig ist. Abbildung angepasst nach Schröder et al. [51]

die Produktion des Shigatoxins akute Vergiftungserscheinungen auch ohne eine Invasion in das Epithelgewebe des Darms aus. Allgemein beobachtet man seit dem Einsatz gängiger Antibiotika eine starke Tendenz zur Ausbildung von Resistenzen. Gegen die Klasse der Sulfonamide, Tetracyclin, Ampicillin und Trimethoprim-Sulfamethoxazol zeigt sich eine große Zahl von Stämmen widerstandsfähig und es tritt kein Therapieerfolg auf. Aus diesem Grunde hat die Weltgesundheitsorganisation WHO dazu aufgerufen, einen Entwicklungsschwerpunkt auf neue Therapeutika gegen Shigellenruhr zu legen.

Um die Darmzellen zu attackieren bilden Shigellen einen komplexen Mechanismus aus, der den Schutz der Epithelwand umgeht. Shigellen sind dabei in der Lage, durch M-Zellen und Makrophagen in die Enterozyten der Schleimhaut einzudringen. Der Weg über M-Zellen ist durch deren enge Assoziation mit den Makrophagen gekennzeichnet, durch deren Befall die Transzytose ermöglicht wird (Abbildung 1.1). Die Invasion (gesteuert über das Invasin IpaB) der Makrophagen induziert deren Apoptose (über die Produktion von IL-1 β), welche wiederum durch Freisetzung von u.a. IL-18 den basolateralen Zugang in die Enterozyten ermöglicht. Insgesamt handelt es sich dabei um eine 'Umprogrammierung' der regulären Immunantwort. Innerhalb des Epithelgewebes

verbreiten sich die Bakterien dann durch Freisetzung von VirG (IcsA), welches die Aktin-Polymerisation auslöst, sehr schnell von Zelle zu Zelle und infizieren so großflächig den Dickdarm. [51,52]

Das gesamte Virulenzsystem von *Shigella*-Bakterien ist auf einem einzigen Virulenzplamid kodiert und zentral durch die Expression der Proteine VirB und VirF gesteuert. Der Regulationsmechanismus basiert auf den Signalen von Temperatur, pH-Wert, Osmolarität und Superhelizität der bakteriellen DNA. Zusätzlich ist das Vorhandensein modifizierter tRNAs ein notwendiges Kriterium für die effiziente Translation von VirF-mRNA. Diese Hypermodifikation findet durch das Enzym tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT) statt, welches das genetisch codierte Guanin am Anticodonloop von tRNA^{Asp}, tRNA^{Asn}, tRNA^{His} und tRNA^{Tyr} zunächst gegen die Base preQ₁ (7-Aminomethyl-7-deazaguanin) an der *wobble*-Position austauscht. Diese wird dann weiter zu Q (7-(((4,5-*cis*-Dihydroxy-2-cyclopenten-1-yl)amino)methyl)-7-deazaguanosin) umgewandelt. Die hochspezifische Erkennung am RNA-Motiv U³³G³⁴U³⁵N³⁶ (N=A,C,G,U) erfolgt über Wechselwirkungen mit Arg286 und Arg289. [52–55]

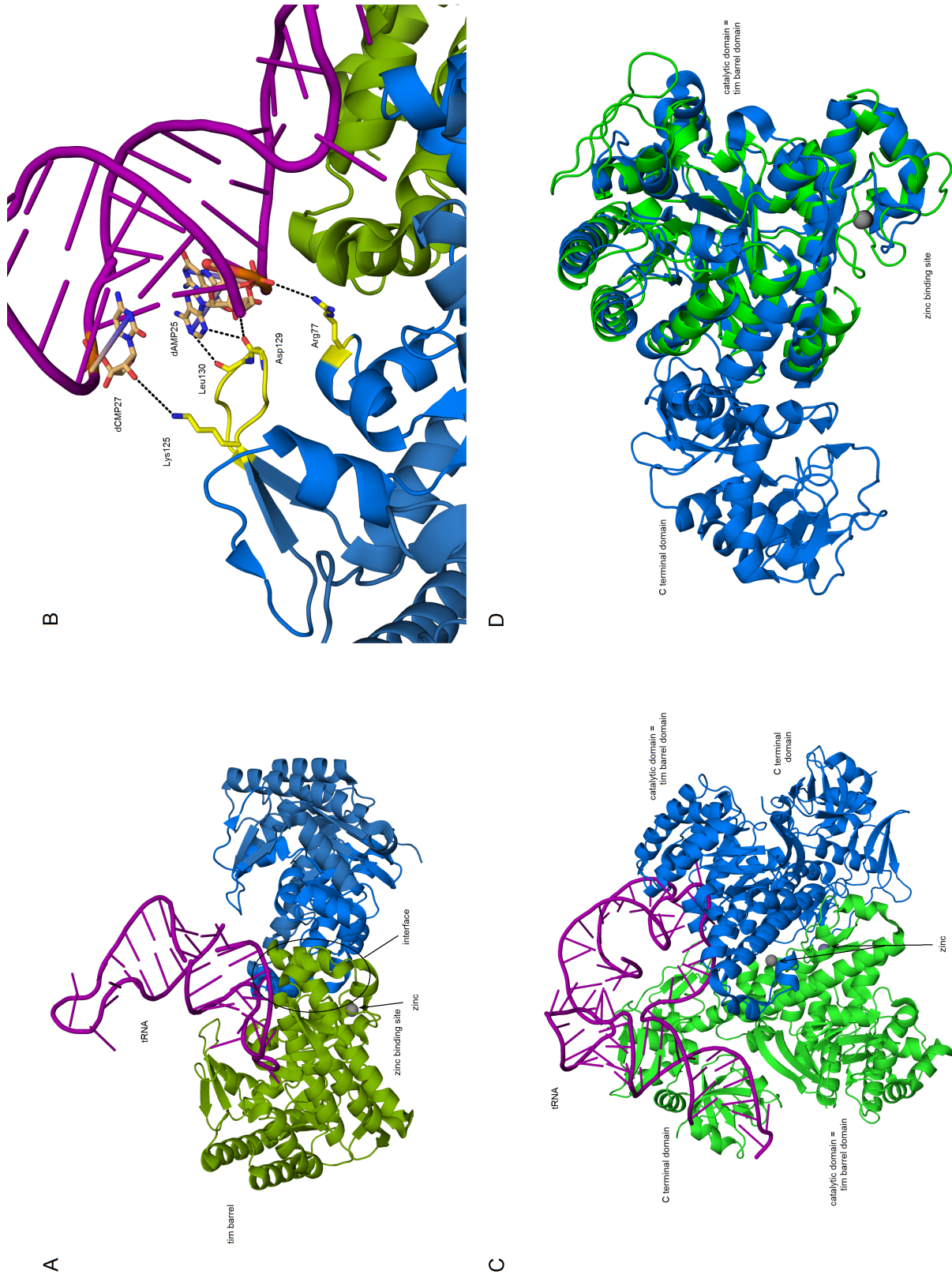
Auf dem Weg zu neuen, wirksamen und selektiven Therapeutika gegen *Shigella* könnte hier ein entscheidender Ansatzpunkt gegeben sein. Durchbricht man mit einer Inaktivierung oder Blockade der TGT das Virulenzsystem, so kann das Eindringen in das Epithelgewebe verhindert und damit der Ausbruch der Shigellose verhindert werden. TGTs treten in allen Domänen der belebten Welt auf, jedoch in unterschiedlichen Modifikationen. Lediglich in Eubakterien (wie *E.coli* und somit auch *S.flexneri*) wird preQ₁ als Substrat erkannt, in Archaeobakterien liegt eine ausschließliche Spezifität für preQ₀ (7-Cyano-7-deazaguanin) vor, in Eukaryoten wird direkt Queuin in die tRNA eingebaut, obwohl die kleineren Moleküle preQ₀ und preQ₁ ebenfalls umgesetzt werden. Die Substratspezifität ist dabei Ausdruck weitreichender struktureller Unterschiede der TGTs. Durch Vergleich der Sequenzidentität verschiedener Spezies konnte die evolutionäre Entwicklung der TGT nachvollzogen werden: Ausgehend von einem Vorläuferprotein mit abzweigendem Ast zu Archaeobakterien fand die Differenzierung über Eubakterien hin zur spezialisierten Form bei den Eukaryoten statt. Die Sequenzidentität zwischen Eubakterien und Archaeobakterien liegt beispielsweise bei nur 20–25%, während zwischen *Homo sapiens* (Eukaryot) und *Zymomonas mobilis* (Eubakterium) ein Wert von 43% gefunden wird. [54,56] Ausgehend von den Befunden über die Selektivität an der katalytischen Tasche war es in den letzten Jahren möglich, hochgradig selektive wie potente Liganden für die Bindetasche der TGT aus *Zymomonas mobilis* mittels rationalen,

strukturbasierten Wirkstoffdesigns zu entwickeln. [57–61] Mit einer Sequenzidentität von 60.4% zu TGT aus *S. flexneri* eignet sich dieses Modellprotein auf Grund der leichten Zugänglichkeit und guten Charakterisierbarkeit mit Röntgen-Protein-Kristallographie sowie biochemisch nahezu identischer Eigenschaften hinsichtlich der tRNA-Modifikation hervorragend für die Ligamentwicklung. [62–64]

Bemerkenswert ist, dass neben den Differenzen in der Bindetaschenausprägung auch die Quartärstruktur des katalytisch aktiven Enzyms bzw. dessen Komplexes mit tRNA variiert. Für die eukaryotische Variante wurde mehrfach über eine heterodimere Struktur mit nur einer katalytischen Untereinheit TGT und einem weiteren Protein Qtrtd1 berichtet, die bisher jedoch nicht strukturell charakterisiert werden konnte. [56,65,66] Durch getrennte Expression der beiden Untereinheiten und anschließende *in vitro* Heterodimerbildung konnte die Zusammensetzung kürzlich sowohl mittels nativer Massenspektrometrie als auch durch einen funktionellen Assay verifiziert, mit Röntgen-Proteinstrukturanalyse die Untereinheit Qtrtd1 aus *mus musculus* als Homodimer charakterisiert werden. [67] Im Gegensatz dazu modifizieren eu- und archaebakterielle TGT nur in homodimerer Form die vorhandene tRNA. Für Eubakterien wurde dies am Beispiel der TGT aus *Zymomonas mobilis* durch eine Röntgen-Proteinstruktur für den Kristallverband illustriert. [55] Ebenfalls konnte man deren enzymatisch aktive Zusammensetzung (TGT)₂tRNA in Lösung durch native Massenspektrometrie nachweisen. Dabei ist nur eine der identischen Untereinheiten katalytisch wirksam, die andere stabilisiert über Lys125 und Arg132 die gebundene TGT. [39,68] Auch für *E. coli* wurde auf die Homooligomerisierung bei höheren Konzentrationen ohne die Anwesenheit des Substrats hingewiesen. [62] Die Bindung an archaebakterielle TGT findet auf gänzlich

Abbildung 1.2: Vergleich der tRNA-TGT Komplexe aus Eu- und Archaebakterien: **A**, Für *Zymomonas mobilis* (PDB-Code: 1Q2R) bilden zwei Polypeptidketten (blau und grün) den aktiven Enzymkomplex zusammen mit tRNA (violett). Während der grüne Dimerpartner die katalytische Funktion übernimmt, stabilisiert der blaue die Bindung der tRNA. **B**, Detail der tRNA-Stabilisierung durch den zweiten Dimerpartner. Ein außen liegender Loop übernimmt mit der Seitenkette von Lys125 und der Hauptkette an Asp129 und Leu130 zusammen mit der Seitenkette von Arg77 die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu den nahen Nukleobasen dCMP27 sowie dAMP25. **C**, Für *Pyrococcus horikoshii* (pdb-Code: 1J2B) wird ebenfalls ein Homodimer (Polypeptidketten in grün und blau dargestellt, tRNA in violett) als aktiver Enzymkomplex ausgebildet. Durch eine zusätzliche Domain am C-Terminus erfolgt jedoch die Stabilisierung der tRNA zwingend in einer abweichenden Konformation, sodass eine andere Nukleobase an Position 15 ausgetauscht wird. **D**, Die Überlagerung von TGT Monomeren aus *Zymomonas mobilis* (grün, pdb-Code: 1PUD) und *Pyrococcus horikoshii* (blau, pdb-Code: 1Q2R) zeigt die strukturelle Ähnlichkeit der katalytischen Domänen, die als TIM-Barrel ausgeformt ist, und der Zink-Bindestelle. Archaeobakterien verfügen darüber hinaus über eine weitere Domäne am C-Terminus.

1.2 tRNA-Guanin Transglycosylase in der Pathogenität der Shigellenruhr



verschiedene Weise statt, die tRNA wird an Position 15 statt an Position 34 modifiziert, die Bindetasche ist signifikant kleiner. Auf Grund der geringen Homologie ist die Tertiärstruktur bereits gänzlich abweichend, wenn auch für die Umsetzung des Substrats ein Homodimer gebildet wird. ^[56]

Durch die notwendige Bedingung der Ausbildung einer definierten Quartärstruktur für die katalytische Aktivität eröffnet sich ein weiterer Mechanismus der Hemmung des Enzyms TGT in *Shigella*. Dafür muss ein Ligand an der Protein-Protein-Kontaktfläche (*Interface*) platziert werden, der die Oligomerisierung unterdrückt. Eine Selektivität potentieller Hemmstoffe gegenüber menschlicher TGT ergibt sich aus den unterschiedlichen Komplexpartnern, die ein signifikant verschiedenes *Interface* vermuten lassen. In ersten Studien mit *Interface*-Mutationen an TGT aus *Zymomonas mobilis* konnte durch Löschung von Wasserstoffbrücken eine signifikante Reduzierung der katalytischen Aktivität und das partielle Auftreten monomerer TGT beobachtet werden. ^[39,68] Liganden, die mit ihrem Grundgerüst in der Bindetasche platziert mit einer Seitenkette durch einen Tunnel bis in den Bereich der Protein-Protein-Kontaktfläche reichen, können dort ebenfalls zu strukturellen Veränderungen führen und die Oligomerisierung behindern. ^[61,68] Derartige Effekte wurden parallel zu dieser Arbeit durch Florian Immekus detailliert untersucht. ^[69]

1.3 Motivation und Aufgabenstellung der Arbeit

Da für den regulatorischen Mechanismus der tRNA-Modifikation in *S.flexneri* die Ausbildung des aktiven Homodimers der tRNA-Guanin-Transglycosylase eine notwendigen Voraussetzung darstellt, wurde die Möglichkeit in Erwägung gezogen, diese zu blockieren. Dies sollte sich durch Schwächung und Auflösung des Protein-Protein-Kontakts des Enzyms wirksam realisieren lassen: Die Platzierung eines stark bindenden Liganden im Bereich des *Interface* zwischen den beiden beteiligten Polypeptidketten sollte so die Ausbildung der aktiven Konformation des Enzyms verhindern. Mit den Beobachtungen von Ritschel et al. ^[39,68] konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Modifikation der Seitenketten im *Interface*-Bereich mit verminderter Wechselzahl des Enzyms und einem detektierbaren Anteil als Monomer vorliegender Proteinmoleküle einhergeht. Davon ausgehend und mit dem Ziel, Ansätze für das strukturbasierte Wirkstoffdesign eines PPI-Liganden abzuleiten, galt es in dieser Arbeit zunächst, die Struktur-Affinitäts-Beziehung am Protein-Protein-*Interface* der TGT aus *Zymomonas mobilis*, einem

etablierten Modellsystem für das homologe Enzym in *Shigella*, genauer zu charakterisieren (Kapitel 3.1 und 3.2). Hierbei waren zusätzliche Erkenntnisse für das grundsätzliche Verständnis von Protein-Protein-Kontakten zu erwarten. In weiterer Folge sollte durch eine gezielte Modifikation beteiligter Aminosäuren, basierend auf den zuvor ermittelten Charakteristika, das Protein in monomerer Form dargestellt und strukturell wie funktionell untersucht werden (Kapitel 3.3 und 3.5). Die anschließende Aufklärung einer Proteinstruktur atomarer Auflösung mittels Einkristall-Röntgenstrukturanalyse war als Ausgangspunkt für alle weiteren Überlegungen, die über zu entwickelnde Liganden angestellt werden, nahezu unabdingbar.

Lediglich der Ansatz eines *Tethering-Fragment-Screenings* an einer Cystein-Seitenkette entlang bzw. in unmittelbarer Nähe des *Interface* umgeht die vollständige strukturelle Charakterisierung. Deshalb wurde diese Methode gewählt, um auf unabhängigem Wege erste Erkenntnisse zu relativen Affinitätsabstufungen verschiedener Fragmentmoleküle am *Interface*-Bereich ableiten zu können (Kapitel 3.7). Weiterhin kann durch die notwendige Cystein-Mutante sowie die kovalente Verknüpfung mit einem potentiell bindenden Kleinmolekül die Bindung der Polypeptidketten zusätzlich geschwächt werden. Die Notwendigkeit neu zu etablierender Kristallisationsbedingungen für die weitere strukturelle Aufklärung der Proteingestalt und der Ligandplatzierung kann jedoch auch hiermit nicht umgangen werden. Insofern sollte die Aufklärung einer ersten Proteinstruktur unter Beteiligung eines durch *Tethering* kovalent gebundenen Fragments den Abschluss der experimentellen Arbeiten bilden und den Weg zu weiteren Designzyklen im strukturbasierten Wirkstoffdesign bereiten.

Neben diesen zwei Bereichen, die stark auf das „Zielprotein TGT“ fokussiert sind, sollte zusätzlich an Hand des „Modellproteins TGT“ die Methode der Molekulardynamiksimulation für die *in silico* Charakterisierung von großen biologischen Systemen bzw. von komplexen Fragestellungen wie der Ligandaffinität unter Berücksichtigung vieler Variablen getestet werden. Da die Adressierung eines Protein-Protein-*Interface* mit einem potenten Hemmstoff ein vielschichtigerer Prozess ist als die analoge Platzierung in einer zuvor bereits identifizierten Bindetasche, ist der Einsatz einer solch rechenintensiven computerchemischen Methode durchaus gerechtfertigt (Kapitel 3.1, 3.2 und 3.7). Experimentelle Methodenentwicklung war zwar durch den etablierten Umgang mit TGT in den beteiligten Arbeitsgruppen nicht als Aufgabe vorgesehen, wurde aber im Zuge der Proteinproduktion und der anschließenden Aufreinigung notwendig (Kapitel 3.3).

2 Methodik

2.1 Computermethoden

Molekulardynamik

Zur Durchführung der Molekulardynamik-Simulationen (MD) wurde AMBER11^[70] genutzt. Startstrukturen wurden aus der Proteindatenbank (PDB) übernommen und entweder unverändert eingesetzt oder zunächst in der Aminosäuresequenz mit *Pymol*^[71] modifiziert. Eine Anpassung der Protonierungszustände der Histidine erfolgte nach visueller Kontrolle (HID, HIE). Parameter für das Zinkion in der Struktur wurden von Pang^[72,73] übernommen, der die tetraedrische Geometrie der Koordinationssphäre mittels vier masselosen *Dummy*atomen mit je einer Ladung von +0.5 umsetzt (siehe auch http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/camdl/zinc_protein.cfm). Koordinierende Cysteine wurden mit speziellen Parametern (CYM) verwendet. Um dimere Strukturen zu erhalten, wurde gemäß der Raumgruppe C2 ein symmetrieäquivalentes Monomer hinzugefügt (z.B. pdb-Struktur 1PUD). Liganden sowie nichtwässrige Lösemitel wurden zunächst in *antechamber* unter Verwendung des *generalized amber force field* (*gaff*)^[74] parametrisiert, die Ladungsberechnung erfolgte nach der *bcc*-Methode^[75,76]. *tleap* wurde verwendet, um fehlende Wasserstoffatome hinzuzufügen, die Gesamtladung des Systems mit Hilfe von Natrium- bzw. Chloridionen auszugleichen und das Protein zu solvatisieren (explizites WassermodeLL TIP3PBOX^[77]).

Alle Simulationen wurden unter *periodic boundary* Bedingungen mit *pmemd* oder *pmemd.cuda* unter Verwendung des Kraftfeldes *ff99SB*^[78] mit einem cutoff von 10 Å für nichtbindende Interaktionen, der *particle mesh Ewald*-Methode^[79] sowie des SHAKE Algorithmus^[80] für feste Werte aller Bindungslängen zu Wasserstoffatomen durchgeführt. Die Zeitschritte für die Simulationen betrugen 2 fs; *Langevin Dynamics*^[81] mit einer Kopplungsfrequenz zwischen externem Wärmereservoir und Simulationssystem von 1 ps⁻¹ zur Temperaturregulierung und *isotropic position scaling* mit einer Relaxationszeit von 1 ps zur Druckanpassung wurden genutzt.

Tabelle 2.1: Allgemeiner Algorithmus zum Setup einer MD

	Schritte/Zeit	festgehaltene Positionen	Bedingungen
a,	500	Protein und Zn^{2+} , $500 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$	100 <i>steepest decent</i> , 400 <i>conjugate gradient</i>
b,	2500	–	1000 <i>steepest decent</i> , 1500 <i>conjugate gradient</i>
c,	100 ps	Protein und Zn^{2+} , $50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$	NVT, Aufheizen 0 K ... 300 K
d,	100 ps	Protein und Zn^{2+} , $25 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$	NPT, $p = 1 \text{ bar}$, $T = 300 \text{ K}$
e,	20 ns	–	NPT, $p = 1 \text{ bar}$, $T = 300 \text{ K}$

MD zur Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionsenergien: Grundlage zur Berechnung von freien Bindungsenthalpien mit dem Programmteil *MMPBSA.py* (in weiten Teilen der Methodik nach Gohlke et al. [43] folgend) stellten MD-Simulationen von verschiedenen mutierten Varianten des Proteins TGT (pdb-Eintrag 1PUD) nach dem Schema in Tabelle 2.1 dar. Die erhaltenen Trajektorien wurden mit *ptraj* analysiert (rms, 2drms, clustering, Wasserstoffbrückenbindungen etc.) und die letzten 10 ns der Simulation für die Energieberechnung genutzt. Dazu wurden zunächst die Lösungsmittelmoleküle, alle Gegenionen und die Zinkionen entfernt und eine repräsentative Auswahl von Koordinatensätzen (121 Snapshots) extrahiert. Die Berechnung der Enthalpie erfolgte gemäß dem Poisson-Boltzmann-Modell [75] zur Näherung der solvensvermittelten elektrostatischen Interaktionen sowie dem LCPO-Modell [82] zur Abschätzung der hydrophoben Oberfläche. Einzelbeiträge zur freien Enthalpie ausgewählter Aminosäuren konnten mit der *per residue energy decomposition* berechnet werden, wie sie im Programmteil *MM_PBSA.pl* implementiert ist.

Solvent-mapping eines TGT-Monomers: Der erstmals von Seco et al. [83] publizierten Methodik folgend wurde das Protein in einer Solvensmischung aus Isopropanol und Wasser simuliert. Mit *packmol* [84,85] wurde zunächst eine dichte Packung von iPrOH (12 Moleküle) und H_2O (240 Moleküle) erzeugt, anschließend mit *pmemd* in einer 5 ns-Simulation (NPT, 1 bar, 300 K, Zeitschritt 1 fs, cutoff 8 Å) equilibriert und mit *tleap* Vielfache der Box zur Solvation genutzt. Die Simulation umfasste eine umfangreiche Equilibrierungssequenz analog zu Seco et al. und eine finale Trajektorie von 50 ns (NPT, 1 bar, 300 K, Zeitschritt 2 fs, cutoff 10 Å).

Die Analyse der Verteilung einzelner Atome (iPrOH-C_{Me}, iPrOH-O) erfolgte mittels *grid*-Befehl in *ptraj*, wobei ein Gitter von $0.5 \text{ \AA} \times 0.5 \text{ \AA} \times 0.5 \text{ \AA}$ auf die Solvensbox angewendet wurde. Zur Visualisierung wurde *pymol* verwendet. Es wurden solche Punkte gezeigt, die mindestens das fünffache der mittleren Dichte von iPrOH-O und mindestens das zehnfache der mittleren Dichte von iPrOH-C_{Me} erreichten (der doppelte Wert ergibt sich aus den zwei zu berücksichtigenden Methylgruppen).

Simulationen zur Docking-Verifizierung: Strukturen gedockter Liganden wurden als Monomere behandelt und der allgemeinen Methodik folgend bearbeitet. Die kovalente Anbindung des Liganden erfolgte nach vorheriger Parametrisierung als Lig-S-S-CH₂-CH₃ in *antechamber*. Zusätzlich wurden Parameter für die Disulfidbrücke zum Cystein im Protein aus dem *gaff* entnommen. Die Bindung zwischen Protein und Ligand wurde in *tleap* manuell erstellt. Abweichend von der Standardprozedur wurde die Struktur über mehrere kurze Intervalle aufgeheizt (je 50 ps 0 K ... 150 K, 150 K ... 250 K, 250 K ... 300 K) und die *Restraints* auf Protein und Ligand graduell verringert (je 50 ps $50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$, $15 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$, $5 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ und $2 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$). Zur Auswertung der Ligandenflexibilität wurde dessen Konformation über die gesamte Simulationsdauer von 20 ns mittels *ptraj* in Cluster untergliedert (Methode *hierarchical*, Differenzkriterium *rms 1.5 mass*). Außerdem wurden 2drms Diagramme für den Liganden sowie die an der Bindetasche beteiligten Aminosäuren erstellt. Als Referenzstruktur galt die Docking-Lösung.

Docking

Kovalentes Docking inkl. des Bibliothekentwurfs wurde von Felix Terwesten in seiner Diplomarbeit durchgeführt. Ihm und Tobias Craan, der dazu erforderliche Hilfestellungen geben konnte, sei für das Bereitstellen der Daten herzlich gedankt.

2.2 Experimentelle Methoden

Alle experimentellen Arbeiten wurden unter Einhaltung der erforderlichen Sicherheitsstufen entsprechend dem Gentechnikgesetz bzw. der Biostoffverordnung im S1 Laborbereich durchgeführt. Soweit notwendig wurden Arbeitsgeräte und Medien vor Benutzung sterilisiert (121 °C, 2.5 bar, 20 min; FVA/2, Fedegari Autoclavi SPA) und in steriler Umgebung (HeraSafe KS15, Thermo Scientific) gearbeitet.

Verwendete Chemikalien und Puffer

Alle Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung so genutzt, wie sie geliefert wurden. Puffer wurden jeweils frisch hergestellt und mit Millipore Steritop™ (0.22 µm Porenweite) sterilfiltriert.

Tabelle 2.2: Qualität und Bezugsquellen verwendeter Chemikalien

Stoffbezeichnung	Qualität	Bezugsquelle
Adenosintriphosphat (ATP)		Roche
Agar, bakteriologisch	hochreine Qualität	Carl Roth GmbH & Co. KG
Agarose		Fluka Analytical
Ammoniumacetat	min. 98%, reinst	Riedel-de-Haen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	min. 98%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ammoniumsulfat	min. 99%, p.a.	Fluka Analytical
Ampicillin	min. 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Anhydrotetracyclin-hydrochlorid	96.2%	Fluka Analytical
Brilliant Blau R250		Carl Roth GmbH & Co. KG
Bromphenolblau		Merck KGaA
Chloramphenicol	min. 98%	Carl Roth GmbH & Co. KG
Complete, EDTA frei		Roche
D-Desthiobiotin		IBA
Dimethylformamid (DMF)	min. 99.5%, p.a.	Merck KGaA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	min. 99.8%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Di-Natrium-ethylen-diamino-tetraacetat-dihydrat (EDTA)	min. 99%	Merck KGaA
Dithiothreitol (DTT)	min. 99%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Essigsäure	100%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol	min. 99.8%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
FastRuler™ DNA Ladder, Low Range	SM1103	Fermentas
FastRuler™ DNA Ladder, Middle Range	SM1113	Fermentas
Glucose		
Glycerol	99%, reinst	Acros Organics
Glycin	min. 99%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Guanin		
³ H-Guanin		Hartmann Analytic GmbH
Hefeextrakt		Carl Roth GmbH & Co. KG
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	min. 99.5%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
2-[4'-Hydroxy-azophenyl]-benzoesäure (HABA)		
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	min. 99%	Carl Roth GmbH & Co. KG

Stoffbezeichnung	Qualität	Bezugsquelle
Izit Crystal Dye		Hampton Research
Kanamycinsulfat		AppliChem
Magnesiumchlorid-hexahydrat	min. 99%, p.a.	Merck KGaA
6x Mass Ruler Loading Dye	R0621	Fermentas
Methanol	min. 99.99%, p.a.	Fisher Chemical
Natriumchlorid	min. 99.5%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumdodecylsulfat (SDS)	p.a.	Serva
Natriumhydroxid	min. 99%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Natriumiodid		
PageRuler™ Prestaint Protein Ladder	SM0671/2	Fermentas
Polyethylenglycol MW3350 (PEG3350)		Fluka BioChemica
Polyethylenglycol MW8000 (PEG8000)		Fluka Analytical
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid:N,N-Methylenbisacrylamid 37.5:1)		Carl Roth GmbH & Co. KG
Rotiphorese® 10x SDS-Page		Carl Roth GmbH & Co. KG
Salzsäure	32%, p.a.	Fisher Scientific
SYBR® Safe DNA gel stain		invitrogen
Szintillationslösung	Rotiszint®eco plus	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	99%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trichloressigsäure (TCA)	min. 98%, rein	Fluka Analytical
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	min. 99.9%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (TRIS-HCl)	min. 99%, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG
Trypton/Pepton aus Casein		Carl Roth GmbH & Co. KG
Tween® 20	SigmaUltra	Sigma-Aldrich
Unstained Protein Molecular Weight Marker	SM0431	Fermentas

Tabelle 2.3: Zusammensetzung verwendeter Puffer, Lösungen und Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ammoniumacetatpuffer	150 mM Ammoniumacetat, in H ₂ O, NH ₃ ad pH 7.0
Ampicillinlösung	1.0 g Ampicillin p.a., H ₂ O ad 10 mL
Anhydrotetracyclinlösung	2 mg Anhydrotetracyclin, DMF ad 1 mL
APS-Lsg.	10% (w/v) APS, in H ₂ O
Assay-Puffer (10x)	500 mM HEPES, 100 mM MgCl ₂ , in H ₂ O pH 7.3
Chloramphenicollösung	340 mg Chloramphenicol p.a., Ethanol ad 10 mL
Crypuffer A	20 µL Glycerol p.a., Kristallisationspuffer A ad 80 µL
Crypuffer B	20 µL Glycerol p.a., Kristallisationspuffer B ad 80 µL
Crypuffer C	20 µL Glycerol p.a., Kristallisationspuffer C ad 80 µL

Bezeichnung	Zusammensetzung
Crypuffer D	20 µL Glycerol p.a., 8 µL DMSO, Kristallisationspuffer D ad 80 µL
Entfärbelösung	500 mL H ₂ O, 400 mL Methanol, 100 mL Essigsäure
Färbelösung	500 mL H ₂ O, 400 mL Methanol, 100 mL Essigsäure, 0.05% (w/v) Brilliant Blue G250
GPC-Puffer	150 mM NaCl, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, in H ₂ O pH 7.8
Guaninlösung	188 µM, in H ₂ O
HEPES-Puffer	
Hochsalzpuffer	10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, in H ₂ O pH 7.8
IPTG-Stammlösung	1 M IPTG in H ₂ O
Kanamycinlösung	300 mg Kanamycinsulfat p.a., H ₂ O ad 10 mL
Kristallisationspuffer A	100 mM TRIS, 10% DMSO, 7% (w/v) PEG8000, in H ₂ O pH 8.5
Kristallisationspuffer B	100 mM TRIS, 100 mM NaI, 20% (w/v) PEG3350, in H ₂ O pH 7.8
Kristallisationspuffer C	100 mM TRIS, 10% DMSO, 12% (w/v) PEG8000, in H ₂ O pH 8.5
Kristallisationspuffer D	0.2 M MgAC, 20% (w/v) PEG3350, in H ₂ O
LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, H ₂ O ad 1 L
LB-Agar	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 20 g Agar, H ₂ O ad 1 L
Ligase-Puffer (10x)	400 mM TRIS-HCl, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT, 5 mM ATP, in H ₂ O pH 7.8
Lyse-Puffer	20 mM TRIS, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 Tablette Complete je 50 mL, in H ₂ O pH 7.8
Puffer A	10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, in H ₂ O pH 7.8
Puffer B	10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 M NaCl, in H ₂ O pH 7.8
Puffer C	10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , in H ₂ O pH 7.8
Puffer E	150 mM NaCl, 100 mM TRIS, 1 mM EDTA, 2.5 mM D-Desthiobiotin, in H ₂ O pH 7.8
Puffer R	150 mM NaCl, 100 mM TRIS, 1 mM EDTA, 1 mM HABA, in H ₂ O pH 7.8
Puffer Tango™	33 mM TRIS, 10 mM Magnesiumacetat, 66 mM Kaliumacetat, 0.1 g L ⁻¹ BSA, in H ₂ O pH 7.9 (fertig geliefert, Fermentas)
Puffer W	150 mM NaCl, 100 mM TRIS, 1 mM EDTA, in H ₂ O, pH 7.8
Sammelgelpuffer	1 M TRIS, in H ₂ O pH 6.8
SDS-Laufpuffer	1% (w/v) SDS, 250 mM TRIS, 2 M Glycin, in H ₂ O pH 8.3
SDS-Lösung	10% (w/v) SDS, in H ₂ O

Bezeichnung	Zusammensetzung
SDS-Probenpuffer (4x)	250 mM TRIS, 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) Glycerol, 0.04% Bromphenolblau (w/v), 200 mM DTT, in H ₂ O pH 6.8
SOC-Medium	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0.5 g NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 0.4%(w/v) Glucose
TAE-Puffer (50x)	2 M TRIS, 50 mM EDTA, in H ₂ O pH 7.8
Trenngelpuffer	1 M TRIS, in H ₂ O pH 8.8
Tweenlösung	1% (w/v) Tween [®] , in H ₂ O
2x YT-Medium	16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, H ₂ O ad 1 L

Verwendete Vektoren

Zu Beginn der Arbeit wurde das Plasmid, welches für tRNA-Guanin-Transglycosylase aus *Zymomonas mobilis* codiert, im Vektor pET9d genutzt^[62], der mit einer Kanamycinresistenz ausgestattet ist. Im späteren Verlauf erfolgte eine Neuklonierung mittels BSA I in den Vektor pASK-IBA13plus (IBA GmbH, Göttingen - im Folgenden pASK-IBA13+), der zusätzlich einen *strep-tag*[®] II am Beginn der Aminosäuresequenz sowie eine Ampicillinresistenz codiert und unter Kontrolle eines tet-Respressors steht. Im Zuge dessen wurde das gesamte Gen mit einer optimierten *codon usage* für *E.coli* neu aufgebaut und durch die Firma Genart, Regensburg, synthetisiert sowie in den Expressionsvektor kloniert. Beim Versuch, die Expressionsraten zu erhöhen, wurde in den Vektor pPR-IBA2 (IBA GmbH, Göttingen) umklontiert (ebenfalls mit Ampicillinresistenz, jedoch steht hier die Expression unter Kontrolle eines T7-Systems).

Tabelle 2.4: PCR Bedingungen

Reaktionskomponenten		Reaktionsprotokoll		
parenterale DNA	40 ng	Startphase	120 s	95 °C
Primer forward	125 ng			
Primer reverse	125 ng	Denaturierung	20 s	95 °C
10x Puffer	5 µL	Hybridisierung	10 s	60 °C
dNTP Mix	1 µL	Synthese	150 s	68 °C
H ₂ O	ad 50 µL			Zyklus 18x
DNA Polymerase	1 µL	Endphase	300 s	

Tabelle 2.5: Im Rahmen der Arbeit verwendete Primer zur DNA-Mutagenese

Mutation	Primersequenz 5'- ... -3'
TGT Z.m.(1995)-326E-forward	GCCGTTTGCCAGAAAGAGAGCCGCGCCTATATC
TGT Z.m.(1995)-326E-reverse	GATATAGCGCGGCTCTCTTTCTGGCAACGGC
TGT Z.m.(1995)-339Q-forward	CATTTAATTCGGCGGGTCAGATCTTGGGGCTATG
TGT Z.m.(1995)-339Q-reverse	CATAGCCCCAAGATCTGACCGCCCGAATTAAATG
TGT Z.m.(2010)-158S-forward	GGCATTTGATGAATCTACCCCGTATCCGG
TGT Z.m.(2010)-158S-reverse	CCGGATACGGGGTAGATTCATCAAAATGCC
TGT Z.m.(2010)-281S-forward	CGATATGTTTGATTCTGTTCTGCCGACCCG
TGT Z.m.(2010)-281S-reverse	CGGGTCGGCAGAACAGAAATCAACATATCG
TGT Z.m.(2010)-326W-forward	GTGCAGTTTGTCAGAAATGGAGCCGTGCCTATATTCATC
TGT Z.m.(2010)-326W-reverse	GATGAATATAGGCACGGCTCCATTCTGACAAACTGCAC
TGT Z.m.(2010)-339E-forward	CATCTGATTCTGTCAGGTGAGATTCTGGGTGCAATG
TGT Z.m.(2010)-339E-reverse	CATTGCACCCAGAAATCTCACCTGCACGAATCAGATG
TGT Z.m.(2010)-339E/340C-forward	GATTCGTGCAGGTGAGTGTCTGGGTGCAATGCTG
TGT Z.m.(2010)-339E/340C-reverse	CAGCATTGCACCCAGACACTCACCTGCACGAATC
TGT Z.m.(2010)-339Q/340I-forward	GATTCGTGCAGGTGAGTGTCTGGGTGCAATGCTG
TGT Z.m.(2010)-339Q/340I-reverse	CAGCATTGCACCCAGACACTGACCTGCACGAATC
TGT Z.m.(2010)-92C-forward	GGTCTGCATAGCTGTATGGTTGGGATC
TGT Z.m.(2010)-92C-reverse	GATCCCAACCCATACAGCTATGCAGACC
TGT Z.m.(2010)-330I-forward	CAGAAATGGAGCCGTGCCATTATTCATCATCTGATTCTG
TGT Z.m.(2010)-330I-reverse	CGAATCAGATGATGAATAATGGCACGGCTCCATTCTG
TGT Z.m.(2010)-330C-forward	CAGAAATGGAGCCGTGCCCTGTATTTCATCATCTGATTCTG
TGT Z.m.(2010)-330C-reverse	CGAATCAGATGATGAATA CAGGCACGGCTCCATTCTG
TGT Z.m.(2010)-330D-forward	CAGAAATGGAGCCGTGCCGATATTCATCATCTGATTCTG
TGT Z.m.(2010)-330D-reverse	CGAATCAGATGATGAATATCGGCACGGCTCCATTCTG

Mutagenese

Anpassungen der Aminosäuresequenz wurden durch Primeramplifizierung während einer PCR-Reaktion (siehe Tabelle 2.4, MiniCycler, MJ Research) nach dem Protokoll der *QuikChange II* und *QuikChange Lightning* Kits (Stratagene) durchgeführt. Entsprechende Anweisungen zum Primerdesign wurden berücksichtigt. Alle Primer (siehe Tabelle 2.5) wurden durch MWG Operon, Ebersberg, synthetisiert, aufgereinigt und mittels Massenspektrometrie analysiert. Die PCR wurde mit dem von Hersteller vorgeschlagenen Temperaturprogramm durchgeführt und nicht mutierte, methylierte Templat-DNA anschließend mittels Dpn I-Verdau eliminiert. Die anschließende Transformation von 2 µL der PCR-Reaktionsmischung erfolgte zunächst in Plasmid-Host-Cells der *Escherichia coli*-Stränge XL1-Blue (Stratagene) bzw. XL10-Gold (Stratagene) durch Inkubation auf Eis für 30 min und Hitzeschock (42 °C für 45 s bzw. 30 s). Zur Selektion wurden die Zellen anschließend auf mit entsprechendem Antibiotikum versetztem LB-Agar ausplattiert und bei 37 °C für 16 h inkubiert (Brutschrank, Heareus). Die Anzucht einer Bakterienkultur erfolgte abschließend in Antibiotika-LB-Medium ausgehend von einer vereinzelter Kolonie (37 °C, 225 rpm, innova 4230, New Brunswick Scientific).

Tabelle 2.6: Im Rahmen der Arbeit hergestellte Plasmide und zugehörige Wirtszellen

Variante	Vektor	Wirtszellen
ZM4-W326E-E339Q	pET9d	XL1-Blue, BL21(DE3)Codon+
ZM10	pASK-IBA13+	XL10-GOLD, BL21(DE3)Codon+
ZM10-W326E	pASK-IBA13+	XL1-Blue, BL21 (DE3)Codon+
ZM10-E339Q	pASK-IBA13+	BL21(DE3)Codon+
ZM10-Y330I	pPR-IBA2	XL10-GOLD, BL21(DE3)Codon+
ZM10-Y330C	pPR-IBA2	XL10-GOLD, BL21(DE3)Codon+
ZM10-Y330D	pASK-IBA13+	XL10-GOLD, BL21(DE3)Codon+
ZM10-Y330D	pPR-IBA2	XL10-GOLD, BL21(DE3)Codon+
ZM10-W326E-E339Q	pASK-IBA13+	BL21(DE3)Codon+
ZM10-C158S-C281S	pASK-IBA13+	XL10-GOLD, BL21(DE3)Codon+
ZM10-C158S-C281S-W326E-E339Q	pASK-IBA13+	XL10-GOLD, BL21(DE3)Codon+
ZM10-F92C-C158S-C281S-W326E-E339Q	pASK-IBA13+	BL21(DE3)Codon+
ZM10-F92C-C158S-C281S	pASK-IBA13+	XL10-GOLD, BL21(DE3)Codon+
ZM10-F92C-C158S-C281S	pPR-IBA2	XL2-Blue, BL21(DE3)Codon+
ZM10-C158S-C281S-W326E-E339Q-I340C	pASK-IBA13+	XL10-GOLD, BL21(DE3)Codon+

Das Plasmid wurde aus 4 mL der Kultur mittels dem *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II* (PEQLAB Biotechnologie GmbH) durch eine Kombination von chemischer Zelllyse und schneller chromatographischer Aufreinigung nach dem Protokoll des Herstellers

peQlab, Erlangen, extrahiert und die Mutation durch DNA-Sequenzierung bei der Firma Eurofins DNA, Ebersberg, nachgewiesen. Anschließend erfolgte der Einsatz zur neuerlichen Mutagenese oder aber die finale Klonierung in *E.coli*-Zellen des Stammes BL21-CodonPlus®(DE3)-RIL (Stratagene) (*E. coli* B F⁻ *ompT hsdS*(r_b⁻ m_b⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ(DE3) *endA* Hte [*argU ileY leuW* Cam^r]), im Weiteren als BL21(DE3)Codon+ bezeichnet, ebenfalls mittels Hitzeschock (20 s bei 42 °C), Selektion und Kulturanzucht in mit den entsprechenden Antibiotika versetzten Medien. 0.7 mL der Kultur wurden mit 0.3 mL Glycerol gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

Klonierung

Die Klonierung der Genabschnitte, die für den Strep-tag, den Linker, die Thrombinschnittstelle sowie die verschiedenen TGT Varianten kodieren, erfolgte in Zusammenarbeit mit Jessica Jüngel, Manuel Neeb und Inna Biela. Sowohl der Vektor pPR-IBA2 als auch die Plasmid-DNA der verschiedenen TGT Varianten wurden zunächst mit den Restriktionsenzymen *Nhe*I (New England Biolabs Inc.) (5'-Ende) und *Eco*RV (New England Biolabs Inc.) (3'-Ende) bei 37 °C nach dem Protokoll des Herstellers geschnitten (16 h, Ansatz siehe Tabelle 2.7).

Anschließend wurden die entstandenen Fragmente via Agarosegelelektrophorese getrennt. Aus dem Gel wurden die Banden für die Proteinsequenz (373 kDa) und den geöffneten Vektor (840 kDa) ausgeschnitten und die DNA extrahiert (*peqGold Gelextraction Kit* (PEQLAB Biotechnologie GmbH)). Zur Ligation der beiden Abschnitte wurde zusammen mit Ligase (Ansatz siehe Tabelle 2.7) für 16 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transformation erfolgte anschließend zunächst in *E.coli*-Zellen des XL2-Blue (Stratagene) Stammes nach Angaben des Herstellers. Zur Expression wurden *E.coli*-Zellen

Tabelle 2.7: Bedingungen der Klonierung

Schnitt Vektor bzw. Plasmid-DNA		Ligation	
pPR-IBA2 250 ng μL^{-1}	2 μL	Vektor 10 ng μL^{-1}	3 μL
bzw. Plasmid-DNA 87 ng μL^{-1}	6 μL	Insert 11 ng μL^{-1}	9 μL
<i>Nhe</i> I 10 u μL^{-1}	2 μL	T4 DNA Ligase 5 u μL^{-1}	1 μL
<i>Eco</i> RV 10 u μL^{-1}	3 μL	10x Ligase Puffer	2 μL
10x BSA	3 μL	H ₂ O	auf 20 μL
10x Puffer Tango	3 μL		
H ₂ O	auf 20 μL		

des BL21(DE3)Codon+ Stammes eingesetzt, in die das Plasmid transformiert wurde, welches aus einer Übernachtskultur der XL2-Blue Zellen durch Plasmidpräparation (s.o.) gewonnen worden war. Die Kontrolle der erfolgreichen Klonierung und Transformation wurde mittels Sequenzierung (s.o.) durchgeführt.

Agarose-Gelelektrophorese

Zur präparativen Trennung von DNA-Fragmenten wurde ein 1%iges Agarosegel genutzt. Dazu wurden zunächst 500 mg Agarose in 49.5 mL 1x-TAE-Puffer unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, 0.5 µL SYBR[®] Safe DNA *gel stain* hinzugefügt und die Masse in der Elektrophoresevorrichtung (OWL EASYCAST[™]B1A, Thermo Scientific) geliert. 20 µL Probe wurden mit 4 µL 6x-DNA-Loading Dye (Fermentas) versetzt und zusammen mit Fastruler[™] DNA Ladder Middle Range und Fastruler[™] DNA Ladder Low Range (Fermentas) als Referenz auf das Gel aufgetragen. Anschließend wurde in 1x-TAE-Puffer über 70 Minuten eine Spannung von 100 V (EC250-90, E-C Apparatus Corporation) angelegt. Nach Erkalten des Gels waren die Banden unter UV-Licht (Safe Imager[™]Blue Light-Transilluminator, invitrogen) sichtbar.

Proteinexpression und Aufreinigung

Die Proteinexpression erfolgte rekombinant aus *Escherichia coli* und erforderte in Abhängigkeit des Vektors verschiedene Vorgehensweisen, die nachfolgend einzeln beschrieben sind.

pET-Vektor

Die Zellen wurden zunächst in einer Vorkultur (10 mL Kanamycin/Chloramphenicol-LB-Medium, 37 °C, 225 rpm, 24 h) angezüchtet, diese in eine Hauptkultur (2 L Kanamycin/Chloramphenicol-LB-Medium, 37 °C, 225 rpm) überführt und bis zur optischen Dichte ($\lambda = 595$ nm) von 0.6 ... 0.8 inkubiert. Anschließend erfolgte die Überexpression nach Induktion mit 1 mmol L⁻¹ IPTG bei 15 °C über 14 h.

Die Extraktion des Proteins erforderte zunächst das Abtrennen der Zellen durch Zentrifugation (10 000 rpm, 4 °C, 10 min; Avanti J-25, Beckmann Coulter), gefolgt von Resuspendieren in 50 mL Lysepuffer und Zellaufschluss mittels Ultraschall (6 mal 1.5 min, 4 °C, DutyCycle 80 %, Output Control 3; Sonifier 250, Branson). Anschließend wurden die restlichen Zellbestandteile vom gelösten Protein durch Zentrifugieren

abgetrennt (25 000 rpm, 4 °C, 60 min).

Die säulenchromatographische Aufreinigung (Äkta FPLC, Amersham Pharmacia Biotech, 5-Wege-Pumpe, UV-Detektor $\lambda = 280 \text{ nm}$, Leitfähigkeitssensor) erfolgte über zwei Schritte. Zunächst wurde an einem Anionenaustauscher (*HighLoad* Q-Sepharose, 26/15, GE Healthcare) das gewünschte Protein aus dem Zelllysats adsorbiert, mit Puffer A gewaschen und bei einer anschließenden fraktionierten Elution mit einem Gradienten von 0 % ... 100 % Puffer B gegen Puffer A vorgereinigt erhalten. Die Identifizierung erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese. Die vereinigten Fraktionen wurden bis zu einer Konzentration von 1 M mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt und an einer hydrophoben Matrix (*HighLoad* Phenyl-Sepharose, 26/15, GE Healthcare) das gewünschte Protein wiederum adsorbiert, mit Puffer C gewaschen und ebenfalls fraktioniert eluiert (Gradient Puffer C mit 0 % ... 100 % Puffer A). Die gelelektrophoretisch identifizierten Produktfraktionen wurden vereinigt und bis zu einer Konzentration von ca. 3 mg mL^{-1} eingengt (Vivaspin 20 bzw. 6, 30 kDa, in Multifuge 3SR, Heareus, bei 3000 rpm).

Die finale Reinigung erfolgte durch Mikrokristallisation des Proteins während einer Dialyse des Konzentrats gegen 5 L Puffer A (Dialyseschlauch Zellu Trans 3.5, MW 4 kDa ... 6 kDa, 28 μm , Carl Roth GmbH & Co. KG), 4 °C, 24 h ... 48 h). Erhaltenes Präzipitat wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und in Hochsalzpuffer zu einer Konzentration von 12 mg mL^{-1} Protein rückgelöst.

Konnten bei der Dialyse keine Mikrokristalle erhalten werden, so wurde das Konzentrat einer dritten säulenchromatographischen Aufreinigung an einer Gelpermeationsmatrix (*HighLoad* Superdex 200 bzw. 70, 26/60, GE Healthcare) unterzogen. Die Elution erfolgte hierbei mit GPC Puffer. Die Produktfraktionen wurden abschließend bis zu einer Konzentration von 4 mg mL^{-1} eingengt. Gereinigte Proteine wurden stets bei -20 °C aufbewahrt.

pASK-IBA13+-Vektor

Die Zellen wurden zunächst in einer Vorkultur (10 mL Ampicillin/Chloramphenicol-LB-Medium, 37 °C, 225 rpm, 24 h) angezüchtet, diese in eine Hauptkultur (2 L Ampicillin/Chloramphenicol-2xYT-Medium, 37 °C, 225 rpm) überführt und bis zur optischen Dichte ($\lambda = 595 \text{ nm}$) von 0.6 ... 0.8 inkubiert. Anschließend erfolgte die Überexpression nach Induktion mit 0.2 mg L^{-1} Anhydrotetracyclin bei 18 °C über 14 h.

Die Extraktion des Proteins erforderte zunächst das Abtrennen der Zellen durch Zentrifugation (10 000 rpm, 4 °C, 10 min), gefolgt von Resuspendieren in 50 mL Puffer W und

Zellaufschluss mittels Ultraschall (6 mal 1.5 min, 4 °C). Anschließend wurden restliche Zellbestandteile vom gelösten Protein durch Zentrifugieren abgetrennt (25 000 rpm, 4 °C, 60 min).

Die säulenchromatographische Aufreinigung wurde an einer Streptactin-Superflow-Sephrose (IBA; Säule 16/10, GE Healthcare) durchgeführt, wobei das Lysat direkt aufgetragen und anschließend mit Puffer W bis zum Erreichen der Basislinie am UV-Detektor gespült wurde.^[86] Adsorbiertes Protein wurde zunächst mit Puffer E bis zum erneuten Erreichen der Basislinie eluiert und direkt aufgefangen. Nach Einengen bis zur gewünschten Konzentration von 3 mg mL⁻¹ oder einem maximalen Volumen von 2 mL wurde die Aufreinigung an der GPC wie oben beschrieben durchgeführt.

Im finalen Schritt erfolgte die Abtrennung des Strep-tag mittels Thrombin (*thrombin cleavage kit*, Novagene). Dazu wurden nach Herstellerangaben Proteinlösung und Thrombin für 20 h bei 20 °C inkubiert, anschließend das biotinylierte Thrombin sowie der abgespaltene Strep-Tag durch Zugabe von Streptavidin-Agarose gebunden und durch Filtration abgetrennt. Die fertige Proteinlösung wurde zur gewünschten Konzentration eingengt und bei -20 °C aufbewahrt.

pPR-IBA2-Vektor

Die Zellen wurden zunächst in einer Vorkultur (10 mL Ampicillin/Chloramphenicol-LB-Medium, 37 °C, 225 rpm, 24 h) angezüchtet, diese in eine Hauptkultur (2 L Ampicillin/Chloramphenicol-2xYT-Medium, 37 °C, 225 rpm) überführt und bis zur optischen Dichte ($\lambda = 595$ nm) von 0.6 ... 0.8 inkubiert. Anschließend erfolgte die Überexpression nach Induktion mit 1 mmol L⁻¹ IPTG bei 18 °C über 14 h.

Die Extraktion des Proteins erforderte zunächst das Abtrennen der Zellen durch Zentrifugation (10 000 rpm, 4 °C, 10 min), gefolgt von Resuspendieren in 50 mL Puffer W und Zellaufschluss mittels Ultraschall (6 mal 1.5 min, 4 °C). Anschließend wurden restliche Zellbestandteile vom gelösten Protein durch Zentrifugieren abgetrennt (25 000 rpm, 4 °C, 60 min).

Die säulenchromatographische Aufreinigung wurde an einer Streptactin-Superflow-Sephrose (IBA; Säule 16/10, GE Healthcare) durchgeführt, wobei das Lysat direkt aufgetragen und anschließend mit Puffer W bis zum Erreichen der Basislinie am UV-Detektor gespült wurde.^[86] Adsorbiertes Protein wurde zunächst mit Puffer E bis zum erneuten Erreichen der Basislinie eluiert und direkt aufgefangen. Nach Einengen bis zur gewünschten Konzentration von 3 mg mL⁻¹ oder einem maximalen Volumen von

2 mL wurde die Aufreinigung an der GPC wie oben beschrieben durchgeführt. Im finalen Schritt erfolgte die Abtrennung des Strep-tag mittels Thrombin (*thrombin cleavage kit*, Novagene). Dazu wurden nach Herstellerangaben Proteinlösung und Thrombin für 20 h bei 20 °C inkubiert, anschließend das biotinylierte Thrombin sowie der abgespaltene Strep-Tag durch Zugabe von Streptavidin-Agarose gebunden und durch Filtration abgetrennt. Die fertige Proteinlösung wurde zur gewünschten Konzentration eingengt und bei −20 °C aufbewahrt.

Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Bestimmung von Konzentration und Reinheit der Proteinlösungen wurde ein UV-Vis-Spektrometer (SmartSpec™, Bio-Rad) genutzt. Es wurden Probenvolumina von 60 µL in UVette®-Küvetten Eppendorf bei 260 nm und 280 nm vermessen und zuvor die Nullabsorption auf den verwendeten Puffer abgestimmt. Nach Gleichung 2.1 wurde anschließend die Konzentration mit Hilfe der sequenzspezifischen Absorption nach ProtParam [87] berechnet.

Konzentrationsbestimmung:

$$c = \frac{A(280 \text{ nm})}{\epsilon_{\lambda} \cdot d} \quad (2.1)$$

> 90% Reinheit bei

$$\frac{A(280 \text{ nm})}{A(260 \text{ nm})} = 1.9 \dots 2.0 \quad (2.2)$$

Die Konzentration von Proteinstammlösungen wurde zudem mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Life Science Group) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Dieser beruht auf der Verschiebung der maximalen spezifischen Absorption von Brilliant Blau von 465 nm zu 595 nm bei Bindung an basische und aromatische Aminosäuren. Als Referenz wurde BSA in den Konzentrationen 0.2 g L^{−1}, 0.4 g L^{−1}, 0.6 g L^{−1} und 0.8 g L^{−1} in GPC-Puffer genutzt.

SDS-Gelelektrophorese

Zur Identifikation und Reinheitsprüfung wurden Proteinlösungen mittels SDS-Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurden kombinierte Sammel-/Trenngele verwendet

(Sammelgel (für 10 Gele): 5 mL Rotiphorese® Gel 30, 18.7 mL H₂O, 6 mL Sammelgelpuffer, 300 µL APS-Lsg., 300 µL SDS-Lsg., 30 µL TEMED; Trenngel (für 10 Gele): 15 mL Rotiphorese® Gel 30, 4.7 mL H₂O, 10 mL Trenngelpuffer, 300 µL APS-Lsg., 300 µL SDS-Lsg., 30 µL TEMED). Je 15 µL Proteinlösung und 15 µL 4x-SDS-Probenpuffer wurden 5 min bei 95 °C inkubiert (Thermomixer Comfort, Eppendorf) und anschließend 15 µL je Geltasche aufgetragen. Die verwendeten Referenzen sind in Tabelle 2.2 angegeben. Als Laufpuffer wurde 1x-Rotiphorese®-SDS-Page verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V (EC250-90, E-C Apparatus Corporation) über 2 h in einer Zelle mit bis zu 4 Gelen gleichzeitig (Mini-PROTEOM™ Tetra System, Bio-Rad). Das Gel wurde danach zunächst in Färbelösung (über Nacht) und schließlich in Entfärbelösung gelagert, so dass die Proteinbanden sichtbar wurden.

Präparation nichtmodifizierter E.coli tRNA^{Tyr}

Mittels dem T7 RiboMAX™ *Express Large Scale RNA Production System* (Promega, Madison, USA) erfolgte die schnelle Synthese von tRNA in hohen Ausbeuten auf Basis des Plasmids ptRNA2^[88] sowie der anschließende Verdau des Plasmids durch RQ1 DNase. Die Aufreinigung erfolgte durch zweimaliges Ausschütteln des Reaktionsansatzes von insgesamt 1 mL mit 2.1 mL von Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 125:24:1 sowie einmalig mit 1 mL von Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 und anschließende Säulenchromatographie an einer illustra NAP™-10 Säule (GE Healthcare). Darauf folgend wurden die 1.5 mL Lösung eingedampft und das Rohprodukt getrocknet (1 mbar, 35 °C, Speed-Vac, DNAmix) und in 2 mL HEPES-Puffer aufgenommen. Die Monomerisierung der tRNA erfolgte über einen Temperaturgradienten (20 °C bis 70 °C in 10 K Schritten a 10 min) und die Inkubation nach Zugabe von 1 mM MgCl₂ über zwei Stunden bei 70 °C. Anschließend wurde über eine illustra NAP™-25 Säule nochmals säulenchromatographisch gereinigt, mit 3.5 mL H₂O eluiert, im Vakuum getrocknet und in Assay-Puffer zur finalen Konzentration von 200 µM aliquotiert. Die Konzentration und Reinheit wurden spektrometrisch bei 260 nm und 280 nm überprüft (Gleichung 2.3). Je Kit mit 50 µL Templat-DNA konnten bis zu 60 µmol tRNA^{Tyr} erhalten werden.

Konzentrationsbestimmung:

$$c = \frac{A(260 \text{ nm})}{0.703 \text{ µM}^{-1} \text{cm}^{-1} \cdot d} \quad (2.3)$$

> 90% Reinheit bei

$$\frac{A(260 \text{ nm})}{A(280 \text{ nm})} = 1.9 \dots 2.0 \quad (2.4)$$

Native Massenspektrometrie

Alle Experimente mit dieser Methodik wurden von Stéphanie Petiot und Dr. Sarah Sanglier-Cianferani am *Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (LSMBO)* in Straßburg, Frankreich, durchgeführt.

Zunächst wurde der Probenpuffer mittels Gelpermetionschromatographie (Zeba 0.5 mL, Pierce) in einen Ammoniumacetatpuffer gewechselt. Die Analyse des Oligomerisationsgrades erfolgte schließlich aus einer 10 µM Lösung mittels nano-ESI-TOF-Massenspektrometrie. Die externe Kalibrierung wurde mittels einer Pferdemoglobinlösung durchgeführt. Die Geräteeinstellungen (Ionisationsspannung, Druck, Injektionsbedingungen) wurden jeweils speziell optimiert.

Enzymkinetischer Assay

Die Durchführung des Assays geht auf Vorarbeiten von Grädler et al. [57,89] zurück. Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter erfolgte dabei durch Beobachtung des Einbaus von radioaktiv markiertem Guanin (enthält je nach spezifischer Aktivität 7.5 % bzw. 20 % ^3H -Guanin) in *E.coli* tRNA^{Tyr} (ECY2). Bei konstanter Konzentration des Guanins von 10 µM sowie des Enzyms (75 nM unter der Annahme einer vollständigen Ausbildung des funktionellen Dimers) wurde die tRNA Konzentration variiert (0.5 µM, 1.0 µM, 1.5 µM, 3.0 µM, 6.0 µM, 15 µM). Die Reaktionen wurden so durchgeführt, dass zunächst ^3H -Guanin, Guanin (zusammen 10 µM), 0.0036 % Tween20 und tRNA in Assay-Puffer vorgelegt und zum Start der Reaktion mit der zu untersuchenden TGT-Lösung (300 nM in Assay-Puffer) 1:1 versetzt wurden (insgesamt 76 µL). Nach 4 min, 8 min, 12 min und 16 min bzw. 21 min wurden je 15 µL der Reaktionsmischung auf ein Filterpapier (*Whatman Glass Microfibre Filters GF/C* 24 mm) pipettiert und in eiskalter 10%iger wässriger Trichloressigsäure die Reaktion gestoppt. Nicht umgesetztes ^3H -Guanin wurde durch intensives Waschen mit 10%iger wässriger Trichloressigsäure sowie Ethanol (je 30 min) entfernt und das Filterpapier bei 60 °C für 45 min getrocknet. Die Messung der Aktivität erfolgte anschließend in 4 mL Szintillationslösung mittels *Liquid Scintillation Analyzer TRI-CARB® 1900CA*, PACKARD. Die Messwerte einer tRNA-Konzentration wurden zur linearen Regression

der initialen Reaktionsgeschwindigkeit v_0 genutzt (Origin 7, OriginLab) und mit Hilfe einer Kalibrierung in physikalische Einheiten übersetzt. Die anschließende Auftragung in einem Michaelis-Menten-Diagramm und der Fit nach untenstehender Gleichung 2.5 führen schließlich zu den enzyspezifischen Kinetikparametern k_{cat} und K_M .

$$v_0 = \frac{\frac{k_{cat}}{c(TGT)} \cdot c(tRNA)}{K_M + c(tRNA)} \quad (2.5)$$

Proteinkristallographie

Zur Kristallisation der Variante TGT C158S/C281S/W326E/E339Q wurde zunächst ein automatisierter Kristallisations-*Screen* von Ralf Pöschke (CTA) am MarXtal mit ca. 1250 Bedingungen der in Tabelle 2.8 aufgeführten *Screening-Kits* durchgeführt. Die Ansätze wurden nach der *sitting-drop*-Methode mit 300 nL der Kristallisationslösung und 300 nL der Proteinlösung von 8 g L⁻¹ in GPC-Puffer angesetzt, Proteinkristalle verschiedener Größe zeigten sich bereits innerhalb weniger Tage Wachstum bei 18 °C bei einer Vielzahl von Bedingungen. Aus Bedingung PACT 51 wurde ein Kristall ausgewählt, zunächst 10 min in Cryopuffer A einem *Soaking* unterzogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Tabelle 2.8: Eingesetzte Kristallisations-*Screens*

Kristallisations- <i>Screen</i>	Hersteller	Präzipitant
AmSO ₄ Suite	Quiagene	Ammoniumsulfat
Anions Suite	Quiagene	hochkonzentrierte Salze
Classics Lite Suite	Quiagene	Salze, langkettige PEG
Classics Suite	Quiagene	Salze, langkettige PEG
Cryos Suite	Quiagene	Salze, PEG (kombiniert mit Glycerol bzw. MPD)
JCSG+ Suite	Quiagene	versch. PEG, Alkohole
JCSG Core I Suite	Quiagene	versch. PEG, Alkohole, Ammoniumsulfat
JCSG Core II Suite	Quiagene	versch. PEG, Alkohole, Ammoniumsulfat
JCSG Core III Suite	Quiagene	versch. PEG, Alkohole, Ammoniumsulfat
JCSG Core IV Suite	Quiagene	versch. PEG, Alkohole, Ammoniumsulfat
PACT Suite	Quiagene	PEG 1500, PEG 3350, PEG 6000
MbClass Suite	Quiagene	Salze, PEG 400, PEG 4000, MPD
MbClass II Suite	Quiagene	Salze, PEG 400, PEG 4000, PEG 8000

Die Varianten TGT E339Q, TGT F92C/C158S/C281S sowie TGT Y330C wurden unter den bekannten Bedingungen für die Wildtyp-Kristallisation mit der *sitting-drop*-Methode erhalten. Dabei wurde 1 mL *well-solution* (TRIS 0.1 M, pH 8.5, PEG8000

7%, DMSO 10%) eingesetzt, die in gleichen Teilen zu je 2 μL mit einer Proteinlösung 10 g L^{-1} in GPC-Puffer zu einem Tropfen gemischt wurde. Kristalle waren bereits nach einem Tag sichtbar und wuchsen innerhalb von zwei Wochen zu hinreichender Größe. Ein Kristall wurde ausgewählt, zunächst 10 min in Cryopuffer B einem *Soaking* unterzogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Ergänzend wurde für TGT Y330C ein *Screening* wie oben beschrieben durchgeführt (ohne MBC I & II, Classics light, Anions und JCSG+). Allerdings wurden zu je 300 μL der Kristallisationspuffer 500 μL der Proteinlösung (6.5 g L^{-1}) pipettiert. Kristalle wuchsen innerhalb einiger Tage in mehreren Bedingungen mit etwa 20% PEG3350 als Präzipitans. Für die Charakterisierung wurde ein Kristall aus JCSG Core I, Bedingung 12 (Kristallisationspuffer D), ausgewählt, in Cryopuffer D für 5 min einem *Soaking* unterzogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das gleiche *Screening* wurde für TGT Y330D ergebnislos durchgeführt.

Zur Kristallisation von TGT K52M wurden die bekannten Bedingungen so verändert, dass schließlich bei der *sitting-drop*-Methode 1 mL Kristallisationspuffer C eingesetzt und im Tropfen 1 μL des Puffers mit 2 μL der Proteinlösung (12 g L^{-1} in Hochsalzpuffer) vereinigt wurden. Innerhalb eines Tages wuchsen rhomboedrische Kristalle, die für 5 min in Cryopuffer C einem *Soaking* unterzogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden.

Ansätze zur Co-Kristallisation von TGT F92C/C158S/C281S zusammen mit *Tether*-Liganden wurden auf unterschiedliche Weise durchgeführt: Zum einen kam eine vorge-schaltete Anbindung ähnlich wie unter 2.2 beschrieben mit anschließender Konzentration der Proteinlösung auf 8 g L^{-1} zur Anwendung, zum anderen wurden der Kristallisationslösung 2 mM DTT und 2 mM des Liganden, gelöst in DMSO, hinzugesetzt. Die sonstigen Bedingungen richteten sich zunächst nach der für das *apo*-Protein, wobei keine Kristallisation beobachtet werden konnte. Protein mit kovalent angebundenem Liganden (TGT F92C/C158S/C281S + TK 174) wurde einem Kristallisations-*Screen* (vgl. Tabelle 2.8) unterzogen, wobei keine geeigneten Bedingungen gefunden werden konnten.

Die Datensammlung aller erhaltenen Kristalle erfolgte wie in Anhang C beschrieben an BL14.2 des Synchrotrons BESSY II mit Röntgenstrahlung der Wellenlänge 0.91841 \AA bei 100 K. Zur Datenprozessierung (Indizierung, Integration, Skalierung) wurde *HKL2000* ^[90] genutzt, die Phasierung erfolgte als *molecular replacement* mit dem Modul *Phaser* ^[91] in CCP4 ^[92] unter Nutzung der Struktur 1PUD ^[64] als initia-

les Modell, die Strukturverfeinerung mittels *Phenix* [93] und COOT [94]. Die gelösten Strukturen wurden in der RCSB Proteindatenbank [95] hinterlegt.

Tethering-Experimente

Bei den Experimenten zur Anbindung von Fragmenten über eine Disulfidbrücke an das Zielenzym kamen Verbindungen aus [96] zum Einsatz, die von Dr. Sascha Brass sowie Thomas Kronenberger synthetisiert wurden. Sämtliche Bestandteile dieser Bibliothek wurden zu 20 mM in DMSO gelöst und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Tabelle 2.9: Reaktionskomponenten der *Tethering*-Experimente

Komponente	Menge	Konzentration
Proteinlösung 4 g L^{-1} in GPC-Puffer	8.1 μL	15 μM
<i>Tethering</i> -Fragmente 2 mM in DMSO	5 μL	200 μM
DTT 1 mM in GPC-Puffer	10 μL	200 μM
GPC-Puffer	26.9 μL	

Das *Tethering* erfolgte in einer *batch*-Methode, wobei alle Komponenten gemäß Tabelle 2.9 zusammenpipettiert wurden, die Reaktion bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 1 h inkubiert und anschließend durch Abtrennen überschüssiger Reaktanden mittels Gelfiltration (illustra™Autoseq™G-50 *Dye Terminator Removal Kit*, GE Healthcare) beendet wurde. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden zunächst mehrere Parameter variiert (siehe Kapitel 3.7). Tabelle 2.9 gibt das letztendlich etablierte Protokoll wieder. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels online HPLC-(ESI)MS (HPLC: Agilent 1100 Microbore, Säule: Monolithic 50/1 ProSwift RP-4H (Dionex), MS: QStar-Pulsar I (Applied Biosystems)) in der Serviceabteilung des Fachbereichs Chemie (Dr. Uwe Linne und Natalia Fritzler). Dabei wurde Wasser/0.05% Ameisensäure (A) und Acetonitril/0.045% Ameisensäure (B) als Lösemittel genutzt und bei 0.2 ml min^{-1} mit einem Gradientenprogramm 2 min 95% (A) / 5% (B), 8 min zu 5% (A) / 95% (B) und weitere 4 min 5% (A) / 95% (B) die Proteinprobe eluiert. Es wurden folgende Messparameter verwendet: DP1 75, FP 265, DP2 15, CAD 2, GS1 35, CUR 25, *enhance all* Modus, Spannung 5000 V. Registriert wurden positive Ionen mit dem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis $m/z = 500 - 2000$. Die Auswertung, insbesondere die Rekonstruktion der Masse der Ionen, erfolgte über die Herstellersoftware, zur Berechnung der prozentualen Verteilung der Produkte wurden die Peakhöhen genutzt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung des Dimer-Interface

Der Homodimerkomplex der TGT (pdb-Code: 1PUD) zeichnet sich durch eine 1618 \AA^2 große Kontaktfläche aus. Auf Grund der C_2 -Symmetrie des dimeren Moleküls finden sich alle Kontakte zweifach. Bis auf drei Ausnahmen (1Q2R, 1Q2S & 1J2B) verfügen alle in der RCSB-Proteindatenbank ^[95] hinterlegten Strukturen der TGT über lediglich ein Molekül in der asymmetrischen Einheit, der Dimerpartner kann durch Ergänzung aus der Kristallsymmetrie erhalten werden. Folglich ist auch das Dimer-*Interface* hinsichtlich seiner Eigenschaften im zeitlichen Mittel als räumlich symmetrisch anzusehen. Deshalb wird im Folgenden jeweils nur eines der beiden Symmetrieäquivalente betrachtet, bei abweichendem Verhalten über beide gemittelt bzw. das signifikantere diskutiert.

Die Bindung der beiden Proteinketten zum funktionellen Enzymdimerkomplex erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken und van der Waals-Kontakte. Betrachtet man zunächst die Kontaktabstände der direkten, gerichteten Wechselwirkungen (Abbildung 3.1) und vergleicht alle verfügbaren Strukturen der TGT in der RCSB an Hand einer statistischen Häufigkeitsverteilung, so können Wechselwirkungen identifiziert werden, die hinsichtlich ihrer Abstandslängen nur gering variieren. Sie lassen sich von solchen unterscheiden, die entweder nur vereinzelt auftreten oder aber eine breite Verteilung hinsichtlich der Abstandslängen aufweisen. Der Befund dieser variablen Geometrieverteilung am Homodimer-*Interface* zeigt, dass die Proteinflexibilität bei der Dimerisierung eine große Rolle spielt. Bei der Proteinkristallographie werden langsam gewachsene Kristalle mit hohem Solvensgehalt und intrinsischer konformativer Freiheit für bestimmte Bewegungen auf molekularer Ebene (Seitenkettenbeweglichkeit, Schleifen-Beweglichkeit, Diffusion von kleinen Liganden) abrupt mit flüssigem Stickstoff in einen eingefrorenen Zustand überführt und anschließend strukturell mittels Röntgenbeugung charakterisiert. Die Strukturinformationen, aus denen die diskutierten Kontaktabstände extrahiert werden, sind somit Momentaufnahmen einer Verteilung

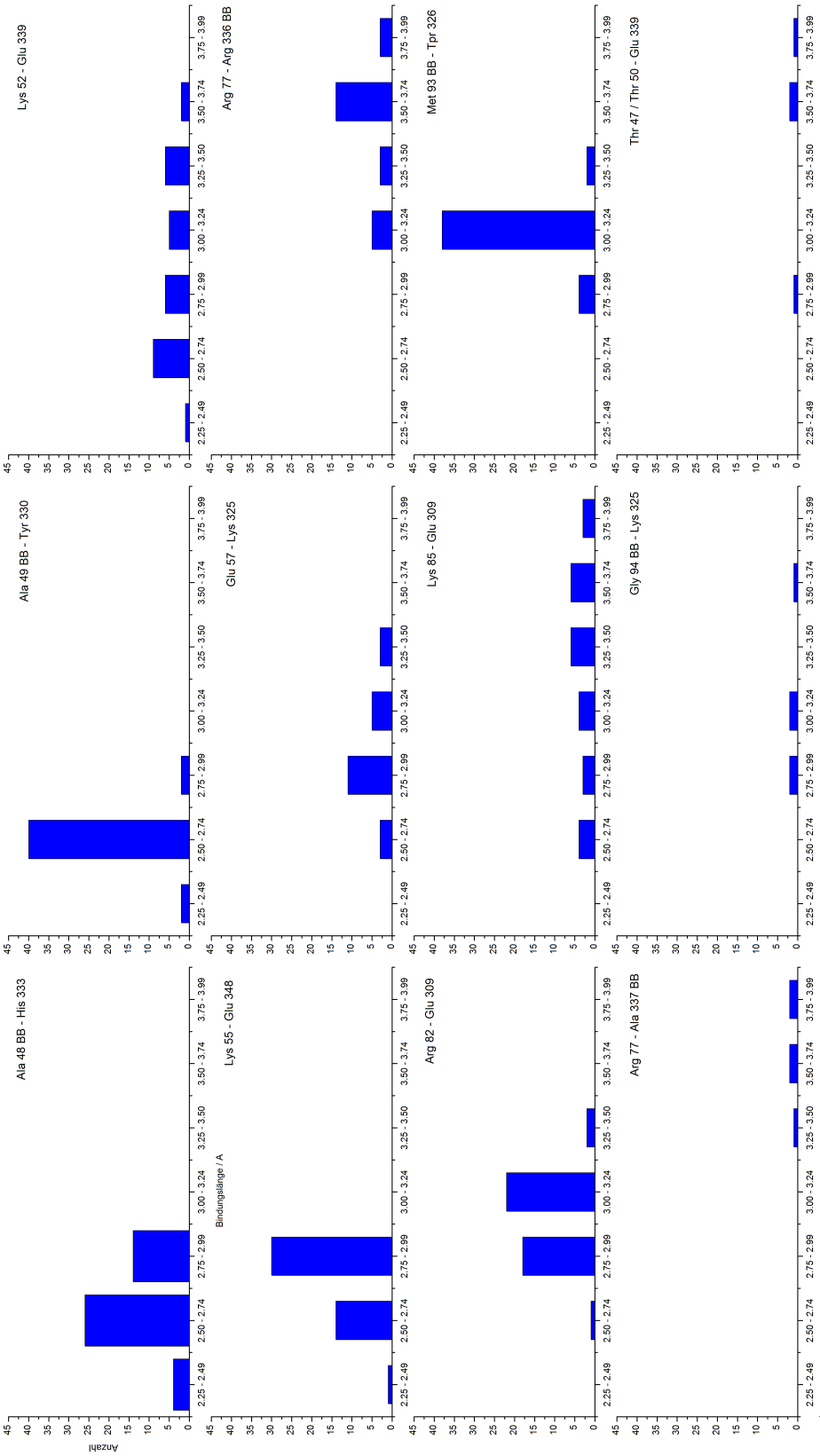


Abbildung 3.1: Statistische Auswertung aller in der PDB verfügbaren TGT Strukturen hinsichtlich der auftretenden Wasserstoffbrückenbindungen. Die Daten wurden mittels des PISA Servers (*Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies*) [97] generiert, es wurde nur der Abstand, nicht jedoch der Bindungswinkel berücksichtigt. Aufgetragen ist die Anzahl vorhandener Kontakte gegen Abstandsintervalle von 0.25 Å. Enge Verteilungen zeigen ein einheitliches, breite Verteilungen ein fluktuierendes Verhalten im Proteinkomplex und können mit der Stabilisierung durch den jeweiligen Kontakt korreliert werden.

der molekularen Geometrie. Wenn unter dynamischen Bedingungen, z.B. in Lösung, verschiedene Geometrien möglich sind, so kann angenommen werden, dass deren statistische Verteilung durch die Häufigkeitsverteilung in Abbildung 3.1 wiedergegeben ist. Zusätzliche Effekte wie verschiedene Kristallisationsbedingungen, die Kristall- und Datensatzqualität, aus der sich die Auflösung ergibt, sowie der Einfluss gebundener Liganden sind den Daten überlagert und lassen sich nicht einfach separieren.

Die statistische Analyse des Wasserstoffbrückennetzwerkes bildet nur einen Teil der möglichen Wechselwirkungen ab, da nur direkte, gerichtete Kontakte berücksichtigt werden. Dabei können polare oder geladene Gruppen des Proteins von Wasser, einem Solvens mit hoher Dielektrizitätskonstante, ebenfalls gut abgesättigt bzw. solvatisiert werden. Krissinel et al. geben deshalb den effektiven Gewinn der Bindungsenergie einer Salzbrücke in wässrigem Medium lediglich mit $-0.9 \text{ kcal mol}^{-1} \dots -1.25 \text{ kcal mol}^{-1}$ etwa im Bereich einer Wasserstoffbrücke (diese liegt bei $-0.6 \text{ kcal mol}^{-1} \dots -1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$) an. Hydrophobe Kontakte, deren Attraktivität auf induzierten Dipolwechselwirkungen sowie auf dem Ersatz einer geordneten Hydrathülle und damit entropischer Begünstigung begründet sind, steigen in ihrem stabilisierenden Effekt auf die Komplexbildung mit der beteiligten Fläche um $7 \text{ cal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$.^[97] Dies wird ebenfalls deutlich, wenn man die Verteilung polarer und unpolarer Aminosäuren an Proteinoberflächen und im Inneren der gefalteten Struktur vergleicht: Jones und Thornton zeigten in einer Untersuchung von 59 Proteinkomplexen aus der Proteindatenbank, dass eine signifikante Differenz in der Hydrophobizität zwischen inneren und äußeren Bereichen der Proteinstrukturen nachweisbar ist.^[7] Weiterhin konnten sie bei Homodimerkomplexen eine eher hydrophobe, bei Heterodimerkomplexen eine hydrophile Oberflächenausprägung der Kontaktflächen feststellen. Für das TGT Dimer (hier beispielhaft für pdb-Code 1PUD) liegt die Fläche der unpolaren Kohlenstoff- und Schwefelatome bei 982 \AA^2 , was 60.7% entspricht, im Gegensatz zu 636 \AA^2 bzw. 39.3%, die für polare Stickstoff- und Sauerstoffatome berechnet werden kann. Dies kennzeichnet den hydrophoben Charakter des Protein-Protein-*Interface* und unterstreicht die Notwendigkeit, hydrophobe Beiträge zusätzlich zu den Erkenntnissen über die Stabilität der gerichteten Wechselwirkungen zu betrachten.

Um Aufschluss über mögliche van-der-Waals-Kontakte zu erhalten und eine energetische Diskriminierung der Dimerstabilisierung aller beteiligten Aminosäuren vornehmen zu können, wurde das Homodimer der TGT in einer Molekulardynamiksimulation untersucht. Die Computermethode ermöglicht es, die Bewegung eines Proteins in einem

weit umfassenden, kastenförmigen Volumenelement mit expliziten Wassermolekülen und periodischen Randbedingungen in einem speziellen Kraftfeld zu beobachten. Dazu werden den einzelnen Atomen und Bindungen Parameter zugewiesen (Masse, Ladung, Kraftkonstanten, Torsionspotentiale etc.) und die Newtonsche Bewegungsgleichung für das Ensemble gelöst. Die wirksame Kraft auf jedes Atom ergibt sich dabei als die Summe intramolekularer und intermolekularer Komponenten, die entweder frei durch den Raum oder entlang von Bindungen wirken können. Das Kraftfeld in AMBER^[70,98,99], dem hier genutzten Simulationsprogramm, berücksichtigt harmonische Bindungspotentiale, harmonische Torsionspotentiale, ein sinusförmiges Potential für die Diederwinkel, ein elektrostatisches Coulomb-Potential sowie ein Lennard-Jones-Potential für die van-der-Waals-Wechselwirkungen. Die Parameter für Proteine werden durch einfache Zusammenfügung der einzelnen Aminosäuren erhalten, diese wiederum sind über quantenmechanische Rechnungen oder als Anpassung gegenüber experimentellen Werten ermittelt worden. Aus den Koordinaten und dem jeden Atom angehefteten Geschwindigkeitsvektor ergibt sich, bei Anwendung einer linearen Extrapolation über einen kleinen Zeitschritt von 1 fs ... 2 fs, eine neue Positionierung des Ensembles, auf die dann wiederum das Kraftfeld angewendet wird. So ist es möglich, während der Simulation die Bewegung aller Teilchen aufzuzeichnen (Trajektorie). Es ist üblich, den Verlauf über einige Nanosekunden zu simulieren, die durchführbare Simulationszeit beschränkt sich durch die Anforderungen an die Rechenleistung. Insbesondere bei großen Proteinmolekülen kann der Aufwand dafür sehr hoch sein.

Als Startstruktur für die Untersuchungen wurde eine *apo*-TGT-Struktur mittlerer Auflösung mit weitgehend vollständiger Charakterisierung der Proteinkette gewählt (pdb-Code: 1PUD^[64]). Da während einer Simulation keine Bindungen geknüpft oder gebrochen werden können, wurden bei der Vorbereitung der Koordinaten die Protonierungszustände der Aminosäuren Glutamat und Aspartat als deprotoniert, für Lysin und Arginin (primäres Amin bzw. Guanidin) als protoniert und für Histidine individuell nach visueller Inspektion an δ -Position (HID 73, 127, 133, 145, 332) oder ϵ -Position (HIE 90, 257, 319, 333, 349) festgesetzt. Das Protein wurde der Kristallsymmetrie folgend zum enzymatisch aktiven Dimer ergänzt. Die kristallographisch bestimmten Wassermoleküle wurden beibehalten, das System in einem Kasten gefüllt mit expliziten Wassermolekülen des TIP3 Modells eingebettet und mittels Gegenionen neutralisiert. Für das Setup der Startstruktur wurde das Programm *tleap* benutzt und Parameter der Kraftfeldparametrisierung *ff99SB* von Simmerling et al.^[78] angewendet. Das

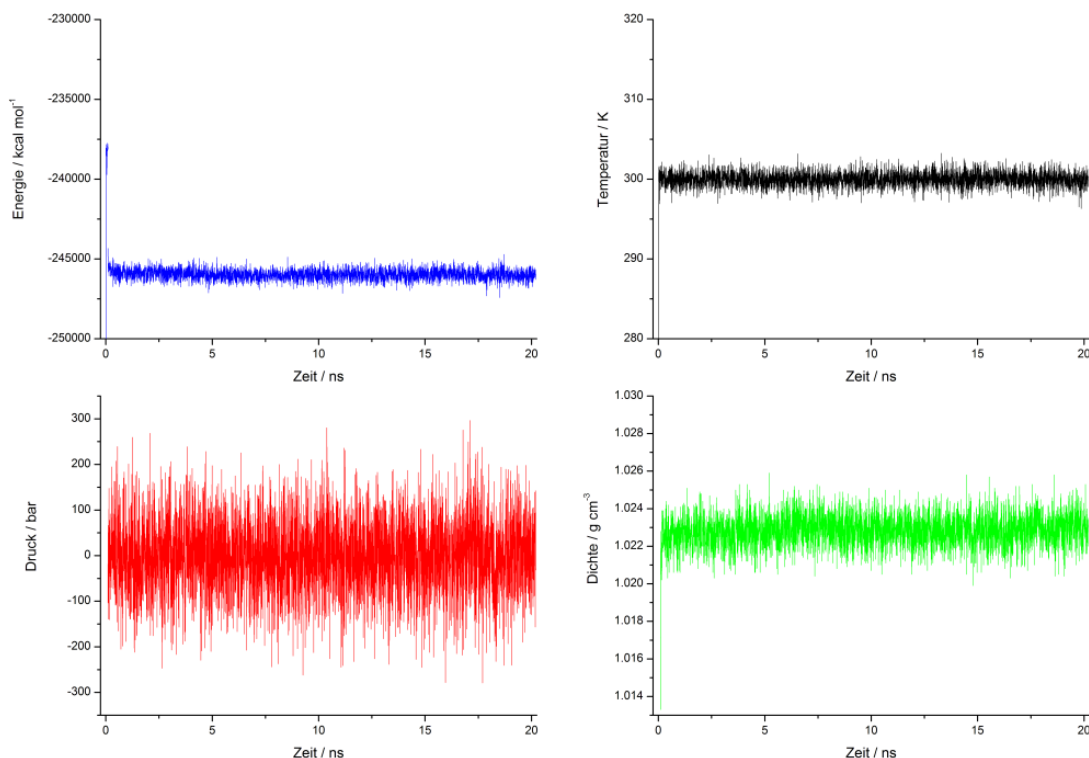


Abbildung 3.2: Qualitätsparameter der MD Simulation aufgetragen gegen die simulierte Zeit in Nanosekunden. Ausgewertet wurden Energie in kcal mol⁻¹ (blau), Temperatur in K (schwarz), Druck in bar (rot) sowie Dichte in g cm⁻³ (grün).

strukturgebundene Zinkatom wurde mit Hilfe der *Cationic dummy atom method* nach Pang et al. [72,73] als ungeladenes Zentralatom mit der Masse des Zinkatoms festgesetzt und von vier tetraedrisch angeordneten, masselosen *Dummy*-Atomen, die jeweils die Ladung +0.5 tragen, umgeben, die sich zudem in die experimentell determinierte Koordinationssphäre aus drei Cysteinen (jeweils als CYM parametrisiert) und einem Histidin einpassen.

Der Simulation vorangestellt wurde eine Minimierung der Wassermoleküle (a) sowie der gesamten Struktur (b), die Einstellung der Systemtemperatur auf 300 K (c) und die Anpassung der Drucks auf Normaldruck (d). Anschließend wurden die dabei angelegten Beschränkungen (*Restraints*) gelöst und die Simulation (e) als NTP Ensemble über 20 ns mit dem Programm *pmemd.cuda* der AMBER 11 Suite gestartet. Die genauen Parameter für die einzelnen Schritte (a) bis (e) können der Tabelle 2.1 entnommen werden. Zur technischen Realisierung stand eine Workstation mit 4 NVIDIA Tesla

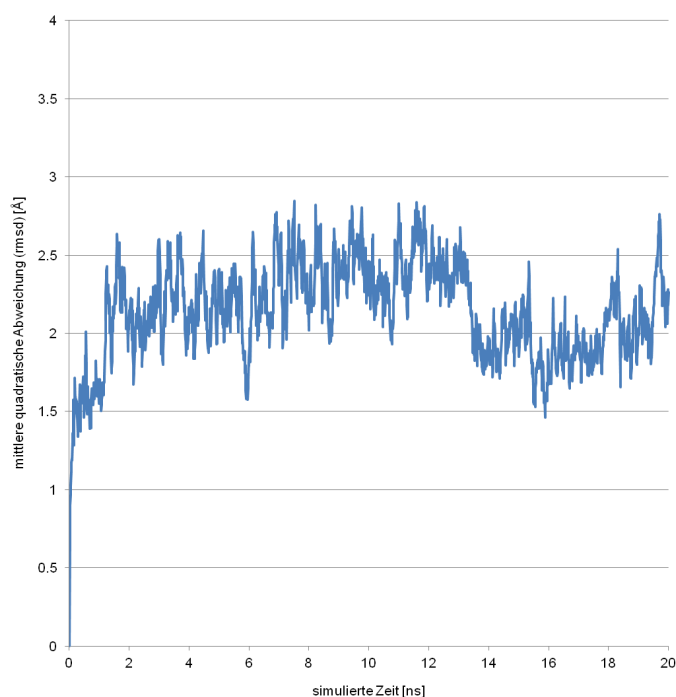


Abbildung 3.3: Mittlere quadratische Abweichung (rmsd) der Koordinaten von TGT Wildtyp im Verlauf der MD Simulation bezogen auf die Startstruktur (pdb-Code: 1PUD) in Angström.

C2050 GPUs zur Verfügung, die seriell genutzt wurden.

Die Auswertung der Molekulardynamiksimulation erfolgte zunächst hinsichtlich ihrer Stabilität mittels der Eigenschaften Gesamtenergie des Systems, Temperatur, Druck und Dichte sowie der mittleren quadratischen Abweichung der Koordinaten des Enzyms (im folgenden rmsd für engl. *root-mean-square deviation*). Diese Parameter wurden aus der Protokolldatei entnommen bzw. aus der Trajektorie mit Hilfe des Programms *ptraj* berechnet und in Abhängigkeit der simulierten Zeit aufgetragen (siehe Abbildung 3.2 und 3.3).

Die Auswertung des rmsd zeigt eine gewisse Veränderung der Mittelwerte der Koordinaten, sobald die Restraints gelöst und das AMBER-Kraftfeld auf das Molekül angewendet wird. Dieses Verhalten ist zu erwarten, denn die ursprünglichen Koordinaten wurden röntgenstrukturanalytisch bei tiefen Temperaturen bestimmt, wohingegen die Simulation bei 300 K stattfindet. Weiterhin stellt das MD-Kraftfeld die realen Verhältnisse nur mit einer gewissen Näherung nach und Abweichungen gegenüber der Realität können durch Vereinfachungen bei der Berechnung durchaus auftreten. Insgesamt stabilisiert

sich der rmsd jedoch schnell nach Beginn der Simulation und schwankt danach um einen Mittelwert zwischen 2.0 Å und 2.5 Å. Die Reproduktion realer Verhältnisse kann gut über die Dichtebestimmung des expliziten Lösungsmittels, das durch TIP3 Wassermoleküle repräsentiert wird, verfolgt werden. Deren Fluktuation während der Simulation um einen Mittelwert von 1.023 g cm^{-3} ist nach anfänglicher Equilibrierung sehr gering (grüne Kurve), ebenso die der eingestellten Temperatur von 300 K (schwarze Kurve). Die große Veränderung des Drucks innerhalb der Simulation von bis zu 300 bar ist auf die Inkompressibilität des Wassers zurückzuführen, die bei geringen Änderungen des Volumens der umgebenden Box große Druckschwankungen entstehen lässt. An Hand der roten Kurve ist jedoch auch ersichtlich, dass die Schwankung um einen Mittelwert nahe 1 bar verläuft. Der letzte Qualitätsparameter kennzeichnet die Stabilität der Simulation über die Gesamtenergie. Am Startpunkt wird nach erfolgreicher lokaler Minimierung der potentiellen Energie des gesamten Ensembles die kinetische Energie der Moleküle so angepasst, dass deren Bewegung der Maxwell-Boltzmannschen Geschwindigkeitsverteilung bei einer Temperatur von 300 K entspricht und anschließend die Box so vergrößert, dass eine Entspannung des Systems möglich ist. Ab diesem Zeitpunkt sollte bei einem stabilen Verlauf die Gesamtenergie des Systems näherungsweise konstant sein. Ist diese Bedingung erfüllt, befindet sich das System in einem Gleichgewichtszustand zwischen allen erreichbaren lokalen Minima. Dieses Verhalten kann man bei der MD-Simulation der Wildtyp TGT beobachten (blaue Kurve). Um eine sichere und reproduzierbare Auswertung des Simulationslaufs zu gewährleisten, wurde entschieden, lediglich die letzten 10 ns der Simulationstrajektorie auszuwerten, während die erste Hälfte allein der Equilibrierung vorbehalten blieb.

Wie die graphische Auswertung anhand des rmsd und der Gesamtenergie bereits zeigt, findet im Verlauf der Simulation keine wesentliche Veränderung innerhalb des Enzyms statt. Der Dimerkomplex bleibt bestehen, nahezu alle Sekundärstrukturelemente sind im beobachteten Zeitraum stabil. Allerdings sind Änderungen in der Tertiärstruktur und Variationen in den großen Sekundärstrukturmerkmalen (außer in *Loop*-Regionen) auf der abgedeckten Zeitskala auch kaum zu erwarten, wenn nicht signifikante Defizite hinsichtlich der Stabilisierung in der gewählten Startstruktur vorliegen.^[100] Im Bereich der Seitenketten gibt es dagegen eine ausgeprägte Beweglichkeit. Auch die Diffusion von Wassermolekülen kann beobachtet werden, weil sich kleine Moleküle deutlich schneller bewegen. Da an dieser Stelle jedoch keine wasservermittelten Kontakte betrachtet werden, wurde das Lösungsmittel nicht in die Auswertung der Trajektorie aufgenommen.

Mithin bilden die während der Simulation gesammelten und ausgewerteten Daten ein Abbild des dynamischen Gleichgewichtszustands der TGT Wildtypstruktur basierend auf der kristallographisch ermittelten Struktur in wässriger Umgebung. Durch die Beobachtung des dynamischen Wechsels in verschiedene Gleichgewichtszustände können in der Simulation weitere Aspekte gegenüber statischen Kristallstrukturen erfasst werden.

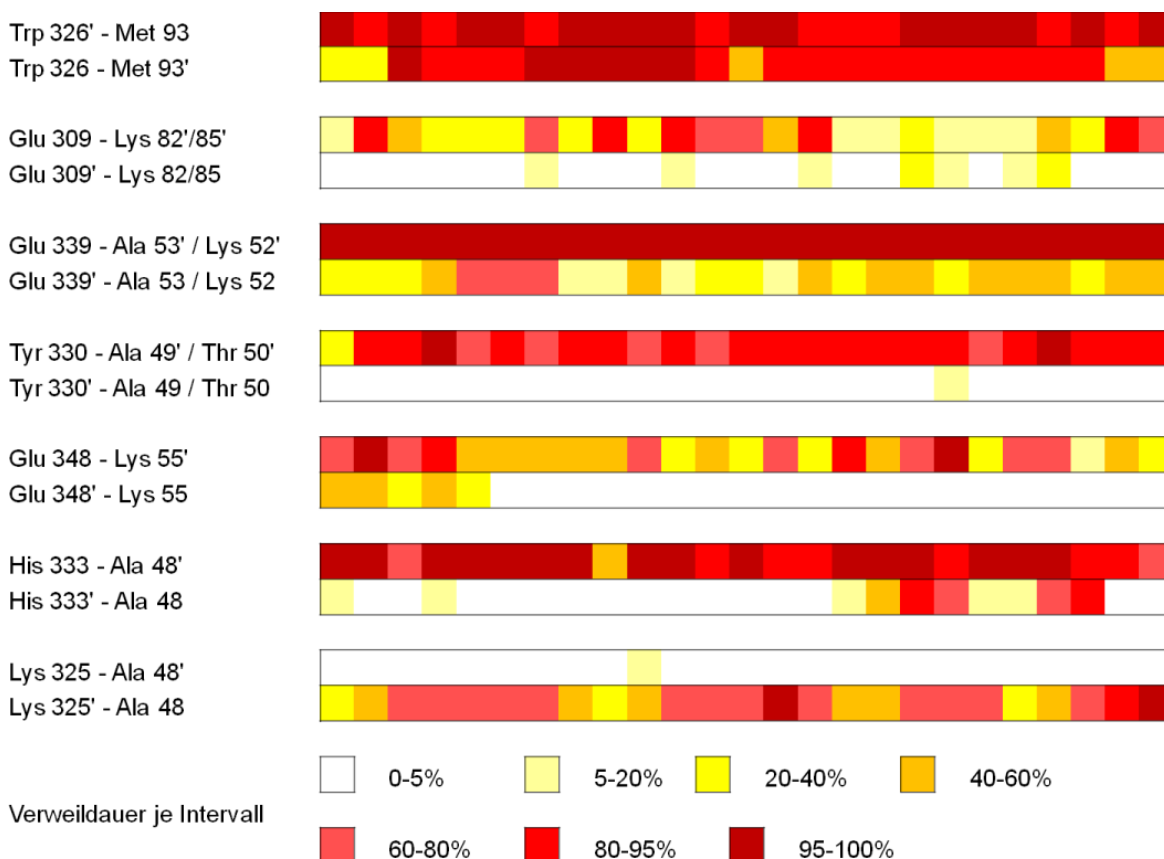


Abbildung 3.4: Verlaufsanalyse der Ausbildung einzelner Wasserstoffbrückenbindungen für die zweiten produktiven 10 ns der Simulation (nach erfolgter Equilibrierung). Jeder mögliche Kontakt ist wegen der Symmetrie des *Interface* zweifach berücksichtigt (obere und untere Zeile). Das prozentual zeitlich räumliche Auftreten wird pro Zeitintervall von je 0.4 ns auf einer Farbskala dargestellt. Durchgehend dunkle Bereiche kennzeichnen stabile Wasserstoffbrückenbindungen. Einflüsse des Bindungswinkels sind hier nicht dargestellt, können aber dazu beitragen, dass ein unterschiedliches Verhalten der beiden 'symmetrieäquivalenten' Seiten auftritt.

Zur Analyse der während der MD ausgebildeten direkten Wasserstoffbrückenbindungen am *Interface* wurden alle Kontakte zwischen Donor- und Akzeptorfunctionalitäten der beiden Monomere gezählt, wenn deren Abstand weniger als 3.2 Å bei einem Bindungs-

winkel größer 120° betrug. In Abbildung 3.4 ist deren Fluktuation im zeitlichen Verlauf der MD (bzw. für die letzten 10 ns) für jede Monomerseite getrennt aufgetragen. Es wurden nur solche H-Brücken berücksichtigt, die länger als 10% der Beobachtungszeit auftraten. Durchgehende rote Balken kennzeichnen stabile Verknüpfungen, je heller die Färbung, umso häufiger besteht kein Kontakt zwischen den angegebenen Aminosäuren im Rahmen der oben genannten Geometriebeschränkungen. Große Unterschiede treten zwischen den beiden Monomerseiten auf. Die Bindung an Ala48 scheint demnach entweder durch His333 oder Lys325, nicht aber durch beide Bindungspartner realisiert zu werden (aus der statistischen Auswertung der pdb-Strukturen ergibt sich hingegen ausschließlich die Bindung an His333). Diese Bindung scheint dann die Lage von Ala49 und Thr50 so zu beeinflussen, dass nur bei Kontakt zu His333 eine günstige Konformation für die Ausbildung der Wasserstoffbrücke zu Tyr330 besteht. Die Bindung zwischen Trp326 und Met93 kann diesen Einfluss hingegen kompensieren. Die Salzbrücken an Glu309 und Glu348 werden nur (noch) in geringem Maße an einer der beiden eigentlich symmetrischen *Interface*-Seiten ausgebildet. Dies könnte die Folge einer asymmetrischen, sich gegenseitig bedingenden Auflösung des Dimerkontakts auf interatomarer Ebene sein. Um dies abzuschätzen und bewerten zu können, wäre eine deutlich verlängerte Simulationszeit notwendig gewesen. Die Stabilisierung des Dimerkontakts durch die Proteinseitenketten nimmt jedoch nach den hier vorliegenden Ergebnissen in folgender Reihenfolge ab: Trp326 > Glu339/Lys52 > His333 > Tyr330 > Lys325 > Glu348/Lys55 > Glu309/Arg82/Lys85. Von untergeordnetem Interesse sind dabei die beteiligten Akzeptoren, die in Form von Carbonylsauerstoffatomen an den Aminosäuren Met93, Ala48 und Ala49 zu den Kontakten beitragen, da diese durch Mutationen nicht veränderbar sind. Die sich als besonders stabil erweisenden Kontakte werden durch solche Aminosäuren gebildet, die entweder dauerhaft geladen sind (Lys, Arg, Glu) oder aber haben einen aromatischen Charakter besitzen (Tyr, Trp, His). Die Ergebnisse decken sich gut mit den Häufigkeitsverteilungen der statistischen Auswertung der Proteindatenbank (Abbildung 3.1), lediglich für Lys325 wird mit Ala48 ein anderer Bindungspartner bei der Simulation gefunden. In den PDB Strukturen konnte das in unmittelbarer Nähe befindliche Carbonylrückgrat des Gly94 als bevorzugter Bindungspartner identifiziert werden. Allerdings trat der Kontakt zu Lys325 nur in einigen Strukturen und mit breiter Streuung hinsichtlich des Kontaktabstandes auf. Für eine genauere Quantifizierung der Einzelbeiträge je Aminosäure wurde das MMPBSA Skript genutzt, wie in AMBER implementiert. In weiten Teilen dem von Gohlke et al. ^[43]

Tabelle 3.1: Energiebeiträge zur Dimerstabilisierung je *Interface*-Aminosäure berechnet mittels MMPBSA aus der Simulation des TGT Wildtyp in kcal mol⁻¹. Die Summe jeder Aminosäure wird einmal in Haupt- und Seitenkette sowie zum anderen in Gasphasen- und Solvationsanteil separiert.

Aminosäure	Hauptkette	Seitenkette	Gasphase	Solvatisierung	Summe
Thr 47	0.08	0.07	-0.97	1.12	0.15
Ala 48	-0.02	-0.89	-2.83	1.92	-0.91
Ala 49	-1.77	-0.69	-5.09	2.64	-2.46
Thr 50	-0.43	-1.43	-1.82	-0.04	-1.86
Lys 52	0.07	-2.79	-38.74	36.02	-2.73
Ala 53	-0.19	-0.64	-2.97	2.15	-0.82
Leu 54	0.12	-0.19	-0.43	0.36	-0.07
Lys 55	-0.51	-3.51	-50.01	46.00	-4.02
Pro 56	-0.34	-0.61	-0.78	-0.17	-0.95
Glu 57	-0.06	0.97	4.09	-3.19	0.91
Thr 58	0.01	0.07	0.01	0.08	0.08
Arg 77	-0.18	-0.42	-6.16	5.57	-0.59
Pro 78	-0.11	-1.30	-1.39	-0.02	-1.41
Arg 82	-0.04	-3.15	-36.21	33.02	-3.19
Lys 85	0.10	-1.27	-35.42	34.25	-1.17
Leu 86	-0.12	-2.90	-3.40	0.39	-3.02
Ser 91	0.17	0.15	-0.17	0.48	0.31
Phe 92	0.52	-2.79	-5.27	3.00	-2.27
Met 93	-1.08	-0.55	-3.85	2.22	-1.63
Gly 94	-1.20	—	-4.57	3.37	-1.20
Arg 289	-0.01	0.28	-0.85	1.12	0.27
Ser 308	0.15	0.10	-1.50	1.75	0.25
Glu 309	-0.13	-0.69	-52.93	52.11	-0.82
Leu 311	-0.20	-1.69	-0.62	-1.26	-1.88
Ala 321	0.10	-0.07	0.71	-0.68	0.04
Val 322	-0.14	-0.16	0.74	-1.03	-0.29
Lys 325	0.11	-1.16	-26.78	25.72	-1.06
Trp 326	-0.10	-3.20	-7.69	4.40	-3.29
Ser 327	-0.07	0.03	-2.20	2.17	-0.04
Ala 329	-0.39	-0.62	-2.28	1.27	-1.01
Tyr 330	-0.87	-3.98	-9.77	4.93	-4.84
His 332	-0.04	0.00	-2.07	2.04	-0.04
His 333	-0.32	-2.33	-11.40	8.76	-2.65
Leu 334	-0.18	-1.36	-3.94	2.40	-1.54
Arg 336	0.07	-0.11	18.05	-18.09	-0.04
Ala 337	0.01	-0.59	-2.91	2.33	-0.59
Glu 339	0.21	0.62	-58.65	59.47	0.83
Ile 340	0.05	-2.16	0.51	-2.61	-2.11
Leu 341	-0.37	-3.21	-2.26	-1.32	-3.58
Ala 343	0.03	-0.07	0.92	-0.97	-0.05
Met 344	-0.03	-1.51	-1.30	-0.24	-1.53
Leu 345	-0.12	-0.71	-0.30	-0.53	-0.83
Glu 348	-0.04	-1.04	-24.41	23.34	-1.07

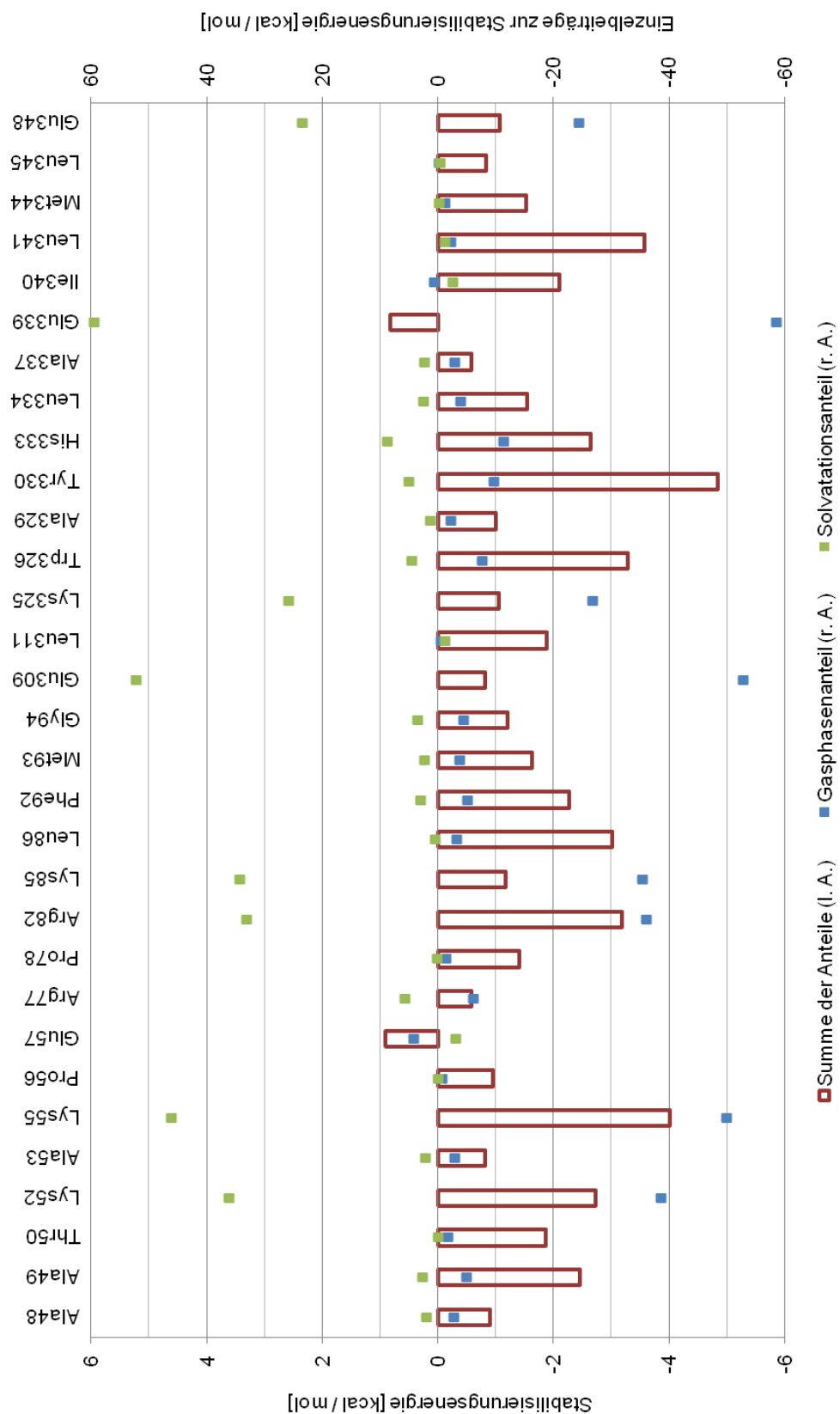


Abbildung 3.5: Graphische Auftragung der Stabilisierungsenergien (Ordinate links, rote Balken) sowie deren Separation in Gasphasen- und Solvationsanteil (Ordinate rechts, blaue bzw. grüne Kästchen) in kcal mol⁻¹ für ausgewählte Aminosäuren am TGT *Interface*. Die numerischen Werte können Tabelle 3.1 entnommen werden.

vorgestellten Algorithmus folgend wurden die Seiten- sowie Hauptkettenbeiträge, aber auch getrennte Energien für Gasphasenattraktivität und Solvation berechnet. Tabelle 3.1 zeigt eine Auflistung aller am *Interface* beteiligten Aminosäuren mit deren Beiträgen zur Stabilisierungsenergie. Die Hauptkettenbeiträge sind bis auf wenige Ausnahmen signifikant geringer als die der Seitenketten, lediglich bei den Aminosäuren, die über eine Carbonylfunktion mit dem anderen Monomer wechselwirken, treten auffällige Abweichungen zu höherer Stabilität auf (Ala49, Met93, Gly94: Signifikanzkriterium $\Delta E \geq 50\%$ sowie $\Delta E \geq 0.25 \text{ kcal mol}^{-1}$).

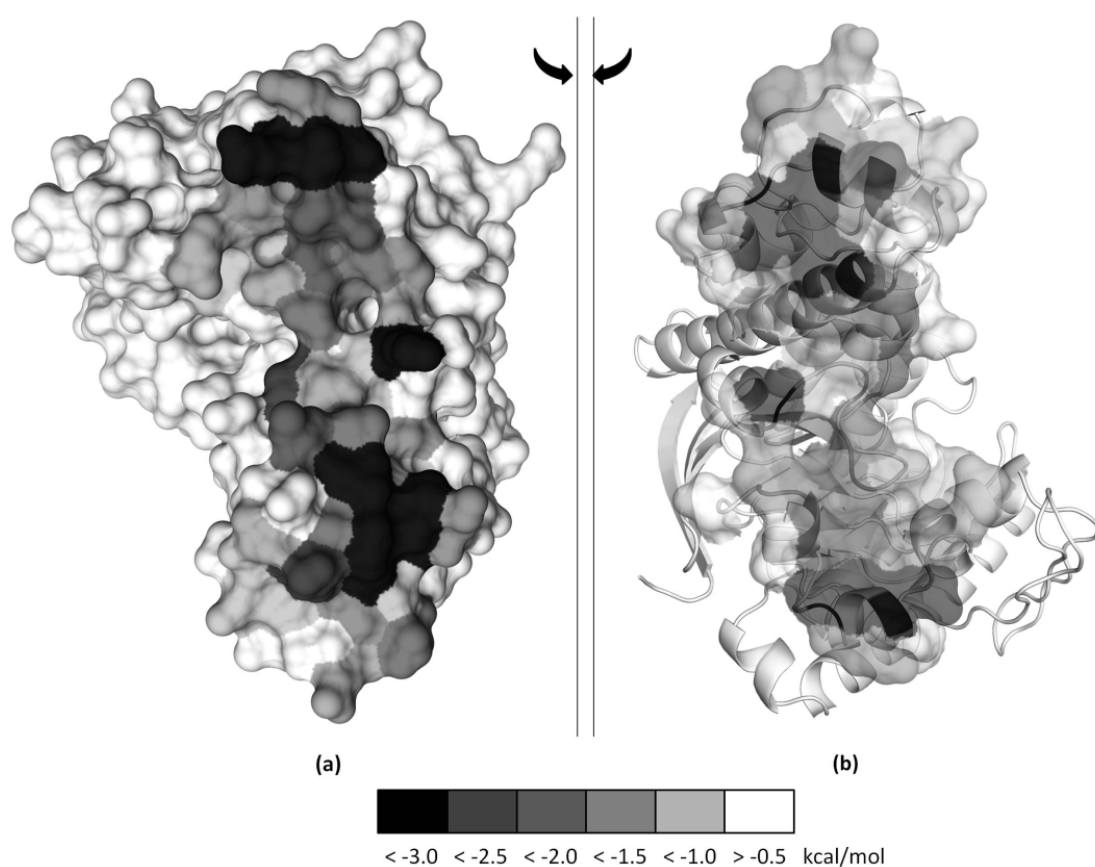


Abbildung 3.6: Illustration der Hot-Spots am Dimer-*Interface* der TGT über eine 6-stufige Graustufenskala. Helle Bereiche markieren keine bzw. nicht signifikante Stabilisierung des Komplexes durch die eingefärbte Aminosäure, dunkle Bereiche die eigentlichen Hot-Spots. Die Darstellung beider Monomere (a) und (b) ist so gewählt, dass diese durch Aufeinandersetzen (Drehung um jeweils 90° zur Bildmitte) in der jeweiligen Geometrie das funktionale Dimer bilden. (a) zeigt die Lösemittelzugängliche Oberfläche des Proteins, (b) unter der halbtransparenten Oberfläche des Interface das darunter liegende Sekundärstrukturmuster.

Auffällig große Werte ergeben sich für die Gasphasenenergie und den Solvatationsbeitrag bei geladenen Aminosäuren. Dies spiegelt die Coulomb-Anziehung zwischen gegensätzlich geladenen Partnern in Salzbrücken wider, der die hohe Solvatationsenthalpie in Wasser als Lösungsmittel mit großer Dielektrizitätskonstante gegenübersteht. Diese beiden Effekte kompensieren sich bei wässrigen Proteinlösungen gegenseitig nahezu vollständig, wobei eine zusätzliche Abhängigkeit vom Salzgehalt der Lösung besteht. Insgesamt verbleibt jedoch für die Coulombkräfte auf Grund der permanenten Ladung ein Restbetrag, da relativ zur Wechselwirkung in Wasser für die Wassermoleküle nur eine Ladungsverschiebung (Dipolmoment) mit resultierender Partialladung von $-0.64e^-$ anzusetzen ist. Diese Beobachtung gilt für die meisten geladenen Aminosäuren am *Interface* der TGT, jedoch Glu81, Asp96, Arg303 sowie Arg336 bilden signifikante Ausnahmen: Die geladene Seitenkette kann keine Salzbrücke zum Dimerpartner ausbilden und muss durch Wasser solvatisiert werden. Somit ist die Gasphasenenergie positiv, hat also einen destabilisierenden Einfluss, der nur durch Solvation ausgeglichen werden kann.

In Abbildung 3.5 werden nur solche Aminosäuren näher betrachtet, die mindestens $0.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ zur Stabilisierung bzw. Destabilisierung beitragen. Die größten Anteile der Stabilisierungsenergie (rote Balken) werden durch Tyr330, Lys55, Leu341, Trp326, Arg82 und Leu86 erbracht (alle stabilisieren mit mehr als $-3.0 \text{ kcal mol}^{-1}$). Unter den sechs am meisten beitragenden Aminosäuren befinden sich somit zwei unpolare (2x Leu), zwei geladene (Lys & Arg) sowie zwei ungeladene, aromatische Aminosäuren mit einer H-Brückenfunktion (Tyr & Trp). Dies spiegelt nicht die prozentuale Häufigkeitsverteilung der Aminosäuretypen entlang des *Interface* wider. Tatsächlich sind nur fünf aromatische Aminosäuren (inkl. His) vorhanden, denen zwanzig unpolare, sechs polare und zwölf geladene Aminosäuren gegenüberstehen. Die aromatische Aminosäuren weisen also bei TGT eine überproportionale Stabilisierung am PPI auf. Ihre durchschnittliche Stabilisierung pro Aminosäure liegt bei $-2.6 \text{ kcal mol}^{-1}$ verglichen mit $-1.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ für unpolar aliphatische, $-0.2 \text{ kcal mol}^{-1}$ für polare und $-1.1 \text{ kcal mol}^{-1}$ für geladene Reste. Ihnen scheint somit eine besondere Rolle bei der Dimerstabilisierung zuzukommen.

An dieser Stelle soll auch untersucht werden, wie die stabilisierenden Aminosäuren entlang des *Interface* angeordnet sind. Dazu ist die Oberfläche des Proteins jeweils entsprechend des Stabilisierungsbeitrags der angrenzenden Aminosäure in Graustufen markiert. Abbildung 3.6 zeigt das aufgeklappte Dimer-*Interface* mit den komplemen-

tären Bindungsstellen in gegenüberliegender Anordnung. Es wird deutlich, dass die stabilisierenden Beiträge nicht breit über das *Interface* verteilt vorliegen, sondern vielmehr einzelne Strukturbereiche einen überproportionalen Anteil an der Stabilisierung auf sich vereinen und somit *Hot-spots* bilden. Interessanterweise liegen die fast alle der kritischen Aminosäuren auf α -helikalen Strukturmotiven, nur an zwei Stellen (Trp326 und Phe92) deutet sich an, dass entscheidende Aminosäuren auf einer sich unmittelbar anschließenden Schleife lokalisiert sein können. Die Lage der *Hot-Spots* innerhalb des Bindungsepitops ist so, dass sie ein Gürtel weiterer Aminosäuren umschließt und somit vor dem direkten Zutritt von Lösungsmittelmolekülen weitgehend abschirmt (vgl. Bogan und Thorn, O-Ring Theorie ^[28]). Die Ausbildung dieser *Hot-spots* ist in besonderem Maße durch die Faltung des Enzyms geprägt, da Aminosäuren aus jeweils mehreren Sekundärstrukturelementen zusammenkommen müssen. Dies lässt vermuten, dass bei der Enzymsynthese zunächst die Tertiärstruktur des Monomers vollständig ausgebildet wird und erst danach zwei einzeln gefaltete Moleküle miteinander dimerisieren. Sollte diese Annahme zutreffen, so ist zu erwarten, dass der strukturelle Unterschied einer monomeren TGT Variante gegenüber der bisher bekannten Dimerstruktur nur von geringem Ausmaß sein sollte und ein Austausch einzelner Monomere zwischen aktiven Dimeren möglich ist. Ob es dabei zu lokalen Strukturanpassungen kommt, soll im weiteren Verlauf der Arbeit geklärt werden.

3.2 Auswahl und in silico Validierung verschiedener Interface Mutanten

Die strukturelle Abwandlung der Aminosäurezusammensetzung des Enzyms mit dem Ziel der Monomerisierung des TGT Komplex ist dann erreichbar, wenn besonders stark zur Dimerstabilisierung beitragende Aminosäuren gegen solche ausgetauscht werden, die einen eher destabilisierenden Effekt auf die Dimerisierungseigenschaft aufweisen. Dabei muss sichergestellt werden, dass Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins im Wesentlichen erhalten bleiben. Eine defensive Strategie bei der Auswahl der Varianten kann mit möglichst wenigen Mutationen und dem Erhalt aller Faltungsschlüsselfunktionen strukturelle Veränderungen, die durch den Austausch von Aminosäuren bedingt sind, vermeiden. Zur Auswahl werden nachfolgend zum einen die Ergebnisse der im vorherigen Abschnitts beschriebenen Ergebnisse als auch die vorangegangenen Mutationsstudien von Ritschel et al. ^[39,68] miteinbezogen. In den letztgenannten Versuchen

konnte eine geringe, konzentrationsabhängige Monomerisierung durch Y330F sowie K52M nachgewiesen werden (vgl. native MS in [39]).

Mit der nun zusätzlich zur Verfügung stehenden Methode der Molekulardynamiksimulation sollen die destabilisierenden Eigenschaften dieser beiden Variationen zunächst analysiert werden. Strukturelle Effekte wurden für K52M in Form einer kompletten geometrischen Unordnung der Region 50 bis 62 an Hand einer Röntgenstrukturbestimmung nachgewiesen. Ausgehend von dieser Beobachtung sollte ebenfalls der Einfluss des Bindungspartners Glu339' charakterisiert werden, der mit Lys52 regelmäßig eine Salzbrücke ausbildet. Hinsichtlich der histogrammischen Auswertung der Kristallstrukturen in der PDB zeigt dieser Kontakt zwar eine hohe Varianz (vgl. Abbildung 3.1), im Rahmen der geometrischen MD Auswertung wird dieser Kontakt hingegen als sehr stabil beschrieben (vgl. Abbildung 3.4). Im Gegensatz dazu steht der positive freie Enthalpiebeitrag für Glu339', der auf Grund der ungünstigen Solvatationseigenschaften bei der Dimerbildung eigentlich für eine Stabilisierung des Monomers sprechen sollte. Deshalb soll durch Austausch gegen Glutamin eine mögliche Destabilisierung durch Wegfall der Salzbrücke einerseits erreicht werden. Andererseits soll über die Beeinflussung des ungünstigen Solvationsbeitrags geprüft werden, ob diese Bindung bedeutend zur Stabilisierung beiträgt. Um eine generelle Tendenz über den Einfluss von Salzbrücken abschätzen zu können, werden an dieser Stelle auch Glu348 und Glu309 zunächst in einer Simulation gegen die ungeladenen Glutaminvarianten ausgetauscht. Es soll weiterhin eine neue Strategie geprüft werden, die sich vom Ansatzpunkt des bisher eher konservativen Austauschs durch Aminosäuren mit sterisch ähnlichen Seitenketten unterscheidet. Wie bereits oben festgestellt, tragen die aromatischen Seitenketten überproportional zur Dimerstabilisierung bei. Da Tyr330 bereits in der vergangenen Studie gegen Phe330 ausgetauscht wurde, sollte nun Trp326 näher betrachtet werden. Die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung zu Met93' fällt sowohl in der statistischen Auswertung wie auch im zeitlichen Verlauf der Simulation der TGT als besonders stabil auf und gehört nach den MMPBSA Berechnungen zu den stabilsten im ganzen *Interface* (Summe bei $-4.92 \text{ kcal mol}^{-1}$). Darüber hinaus bildet Trp326 zusammen mit Tyr330 und Leu341 einen *Hot-spot-Cluster* im Dimerkontakt (vgl. Abbildung 3.6), deren Synergie durch Wegnahme eines stabilisierenden Bindungspartners u.Ü. aufgebrochen werden kann. Beim Austausch sollen sowohl die Wasserstoffbrückendonorfunktion als auch der sterische Anspruch und die Aromatizität der Seitenkette Berücksichtigung finden. Deshalb wird gegen einen flexiblen, sterisch weniger anspruchsvollen Akzeptor

ausgetauscht, der zudem leicht durch das Lösungsmittel solvatisiert und damit die monomere Form stabilisieren kann. Dafür kommen Glutamat und Aspartat in Frage. Die Wahl fiel im vorliegenden Fall auf Glutamat, da durch dessen zusätzliche Methylengruppe in der Seitenkette denkbare Defizite in der lokalen Faltung durch die höhere Seitenkettenbeweglichkeit ausgeglichen werden können. Die Position 326 wird als Bestandteil eines kurzen *Loops* durch zwei Helices flankiert und somit vermutlich in ihrer Lage stabilisiert.

Für eine Validierung wurden zunächst alle Varianten *in silico* erzeugt und mittels Molekulardynamiksimulation analog zum Wildtyp wie oben beschrieben hinsichtlich ihres Beitrags zur Stabilisierung des Dimers untersucht. Im Einzelnen ergaben sich folgende Mutationskombinationen: K52M, E309Q/E339Q/E348Q, Y330F/E339Q, W326E/E339Q. Im zeitlichen Verlauf aller simulierten TGT Varianten zeigte sich wegen des kurzen simulierten Zeitabschnitts erwartungsgemäß keine strukturelle Auflösung des Dimers. Ebenfalls kam es nicht zur massiven Umbildung weiter Bereiche der am *Interface* angrenzenden Sekundärstrukturelemente. Lediglich kleine Veränderungen wurden beobachtet, die jedoch nicht zwingend mit den eingefügten Mutationen in Verbindung gebracht werden konnten. Wie erwähnt, lässt sich insgesamt vermuten, dass eine Zeitskala im Nanosekundenbereich nicht ausreichend zum Erfassen derartiger Bewegungen ist. Längere Simulationsläufe waren aus Kosten- und Aufwandsgründen nicht realisierbar. Lokale Abschätzungen hinsichtlich der Bindungsbeiträge können jedoch aus den gewonnenen Daten abgeleitet werden. Beim MMPBSA Ansatz wird ohnehin die konformative Freiheit des einzelnen Monomers nicht explizit berücksichtigt, sondern nur aus der Beweglichkeit im Komplex abgeleitet. Streng genommen müsste man deshalb zusätzliche Simulationen der separaten Monomere ansetzen, um über die Methode der Thermodynamischen Integration validere Werte zu erhalten. Dieses Verfahren ist jedoch gerade für derart große Systeme wie den TGT Dimerkomplex sehr aufwändig. Zusätzlich konnte in einer Testsimulation des Wildtypmonomers über 50 ns bei visueller Inspektion keine nennenswerte Beweglichkeit von Strukturelementen innerhalb des Proteins festgestellt werden, die über das Maß im Enzymkomplex hinausgeht. Eine Berechnung getrennter Monomertrajektorien für die jeweiligen Varianten wurde deshalb als nicht zielführend angesehen.

Die Änderung der Stabilisierungsbeiträge der ausgetauschten Aminosäuren in den jeweiligen TGT Varianten sowie ihrer Bindungspartner sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Positive Werte repräsentieren einen destabilisierenden Einfluss der eingefügten

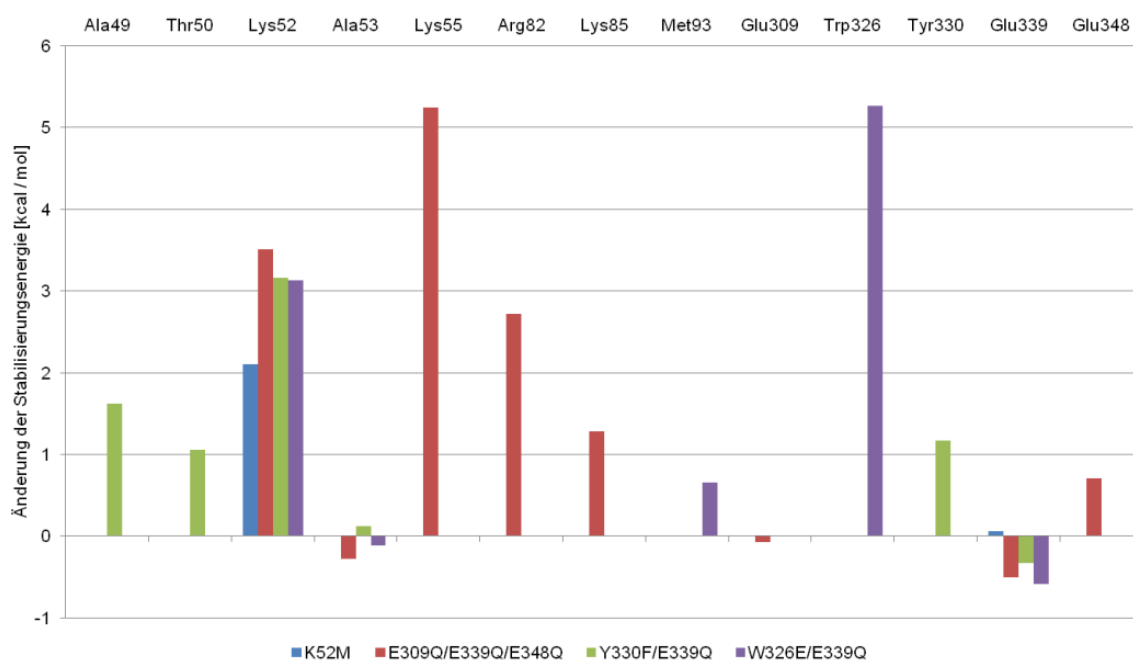


Abbildung 3.7: Graphische Darstellung der Änderung der Stabilisierungsenergie pro Aminosäure bei einzeln simulierten TGT Varianten (farblich getrennt dargestellt) im Vergleich zum Wildtyp der TGT. Ausgewertet wurden nur die mit der jeweiligen Mutation in Verbindung stehenden Aminosäuren. Die obere Achsenbeschriftung führt die im Wildtyp vorhandenen Reste der jeweiligen Positionen auf.

Variation des vorgenommenen Aminosäureaustauschs. Für die bereits publizierte Variante K52M kann über die MMPBSA Methode ein destabilisierender Einfluss an Lys52 berechnet werden, während der Bindungspartner Glu339 nahezu keine Änderung erfährt (insgesamt $2.16 \text{ kcal mol}^{-1}$). Tauscht man diesen Rest gegen Glutamin unter dem Verlust der Ausbildung einer Salzbrücke aus, so tritt zwar bedingt durch die günstigere Solvation der jetzt ungeladenen Aminosäure an Position 339 eine geringe Stabilisierung auf, allerdings erhöht sich auch die Destabilisierung an Lys52 um den Faktor 1.5 (in Summe dann $2.70 \text{ kcal mol}^{-1}$). Dieser kompensierende Effekt lässt sich in allen drei Simulationen, bei denen die Mutation E339Q vorgenommen wurde, analog beobachten. Ein ganz ähnliches Verhalten zeigt sich bei den anderen Salzbrücken an den Positionen 309 und 348: Die Akzeptorfunktionalität ist in ihrem Stabilisierungsbeitrag geringfügig verändert, während die Donoren deutlich an Stabilisierungseinfluss verlieren (Summe E309Q $3.93 \text{ kcal mol}^{-1}$, E348Q $5.95 \text{ kcal mol}^{-1}$). Die Begründung hierfür ist in der (Über-)Kompensation der günstigeren Solvation durch die Reduktion der elektrostatischen Stabilisierung mit dem Wegfall der Salzbrücke zu finden.

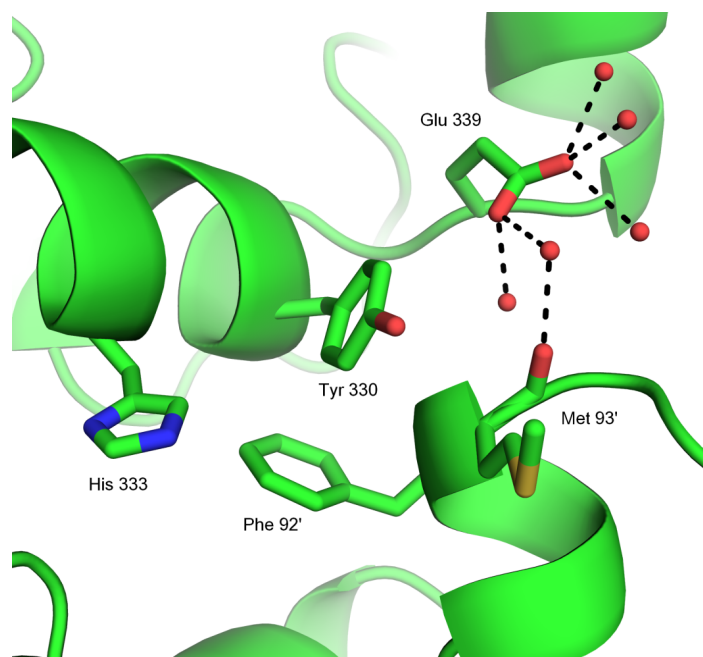


Abbildung 3.8: Glu326 nach 20 ns in der MD Simulation: Eine direkte Bindung zum Dimerpartner besteht nicht, es sind 5 Wassermoleküle im Abstand von 2.6 Å ... 2.7 Å um das Glutamat vorhanden, wobei durch ein Molekül eine Wechselwirkung zu Met93' verbrückt ist. His333, Tyr330 sowie Phe92' liegen in weitgehend unveränderter Konformation im Vergleich zum Wildtyp vor.

Der Verlust der Hydroxylgruppe in Y330F hat mit $3.85 \text{ kcal mol}^{-1}$ einen signifikant größeren Einfluss als die Mutation K52M, womit die Beobachtungen von Ritschel et al. [68] hinsichtlich einer vermehrten Monomerisierung bereits bei höherer Konzentration erklärt wird. Sie äußert sich in destabilisierenden Beiträgen an Ala49, Thr50 sowie dem Tyr/Phe330 Austausch.

Der zweitgrößte Einzelbeitrag zur Destabilisierung des Enzymkomplexes der TGT konnte neben dem E348Q-Austausch für die Veränderung an der Position 326 prognostiziert werden: Da die Donorfunktion des Trp mit Glu gegen einen Akzeptor ausgetauscht wird, stehen sich in der Mutante zwei Partner gegenüber, die nicht in der Lage sind, eine Wasserstoffbrückenbindung direkt zueinander auszubilden. Sie müssen durch Einlagern von Wassermolekülen oder den Kontakt zu anderen erreichbaren Proteinfunktionalitäten abgesättigt werden. Bis zum Ende der Simulation werden solche Kontakte für Glu326 nicht vorgeschlagen, die Carboxylatgruppe dieses Restes verbleibt in der Umgebung einer Solvathülle (vgl. Abbildung 3.8). So werden durch die Simulation innerhalb des Dimer-*Interface* an Glu326 fünf Wassermoleküle gebunden, von denen

nur eines eine Brücke zu Met93' im anderen Monomer herstellt. Folglich wird in der Simulation gezeigt, dass Glu326 einen Zustand bevorzugt, der sich bei dem Monomer zwangslos ergibt: Denn dann ist die Solvatisierung durch Wassermoleküle leicht möglich und energetisch vorteilhaft.

Den Berechnungen folgend stellen die Punktmutationen W326E sowie E348Q die bestgeeigneten Möglichkeiten für die geplante experimentelle Umsetzung der Destabilisierung des TGT Dimer-*Interface* dar. Um allerdings die bisherigen Arbeiten, die mit K52M begonnen wurden, zu erweitern, ist zudem die Mutation E339Q von besonderem Interesse. Alle drei Positionen (326, 339, 348) befinden sich in relativer räumlicher Nähe. In Hinblick auf die Entwicklung eines Protein-Protein-*Interface*-Inhibitors ist es wichtig, nur geringe Änderungen am *Interface* gegenüber dem Wildtyp vorzunehmen. Andererseits werden Liganden eher in Bereichen zu platzieren sein, an denen in der Monomerstruktur Kavitäten bereitstehen, sodass eine Abschirmung des Solvens möglich ist. Daher sollten diese Bereiche möglichst nicht durch Punktmutationen gegenüber dem Wildtyp verändert werden. Die Reste Trp326 und Glu339 befinden sich an exponierten Regionen, sind also von ihrem Standpunkt her aus dieser Sichtweise gut geeignet. Glu348 liegt ungünstig am Rande des *Interface* zum Solvens hin. Für eine Bevorzugung von W326E gegenüber E348Q als Zielmutation spricht zudem die Validierungsmöglichkeit hinsichtlich der Wichtigkeit der Aromatizität der Aminosäure an dieser Position. Nach den Ergebnissen der Simulation am Wildtyp könnten gerade die aromatischen Reste einen besonderen Einfluss auf die Stabilisierung haben. Für die erste experimentelle Umsetzung wird deshalb die Variante TGT W326E/E339Q ausgewählt.

3.3 Destabilisierung des Dimer-Interface: TGT W326E/E339Q

Die im vorangegangenen Abschnitt zunächst ausgewählte Variante TGT W326E/E339Q sollte durch Mutagenese des Gens und rekombinante Expression mittels *E.coli* hergestellt, anschließend aufgereinigt und charakterisiert werden. Das Gen der TGT aus *Zymomonas mobilis* steht, wie von Reuter et al. [62] beschrieben, im Vektor pET9d zur Verfügung. Geplant war, ganz analog zu den Versuchen, die bei Ritschel et al. [39,68] dokumentiert sind, vorzugehen. Bei anfänglichen Versuchen wurden jedoch Probleme mit der etablierten Methodik der TGT Aufreinigung sichtbar, die es erforderten, ein neues Protokoll anzuwenden.

Zur Charakterisierung wurde zunächst die nicht denaturierende nano-ESI Massenspektrometrie genutzt, die es ermöglicht, auch nicht kovalent gebundene Komplexe von Biomolekülen und damit deren Oligomerisierungszustand (Monomer/Dimer) zu detektieren. Ergänzend wurden Untersuchungen mittels analytischer Größenausschlusschromatographie durchgeführt, bei der ein Umpuffern der Proben nicht notwendig war und das Enzym in hoher Konzentration eingesetzt werden konnte. Zur Überprüfung der enzymatischen Aktivität wurde auf den etablierten, funktionellen *in vitro* Assay zurückgegriffen, bei dem die Umsetzung des Substrats ^3H -Guanin an modifizierter *E. coli* tRNA über den Markierungsgrad in Abhängigkeit von Zeit und tRNA Konzentration verfolgt wird. Strukturelle Informationen zu möglichen konformativen Änderungen der Sekundärstruktur, die sich aus den Punktmutationen des Enzyms ergeben, sollten mit Hilfe der Proteinkristallographie erlangt werden.

Mutagenese, Expression und Aufreinigung

Als erste Variante wurde die Doppelmutante TGT W326E/E339Q erzeugt. Zu diesem Zweck wurde aus dem Klon, welcher das Plasmid für TGT E339Q im pET9d Vektor enthält, die Plasmid-DNA präpariert. Durch ein PCR-Verfahren wurde anschließend mit Hilfe des QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit die Mutation W326E in das Plasmid eingeführt und die zweifach mutierte Variante schließlich in *E. coli* BL21CodonPlus(DE3)-RIPL Zellen transformiert.

Die Expression verlief zunächst nach dem Standardprotokoll für die Zellen in Verbindung mit einem Lac-Promotor (T7 System) in LB-Medium über eine kleine Vor- und eine zwei Liter umfassende Hauptkultur zur Anzucht der Bakterien mit anschließender Induktion der Überexpression mittels 1 mM IPTG bei 15 °C über Nacht. Nach Zellernte und Aufschluss wurden die löslichen Proteine extrahiert. Zur Aufreinigung sollte nun ein dreistufiger Prozess genutzt werden. Dieser besteht aus einer Reinigung über Anionenaustauscher- sowie einer hydrophoben Affinitätschromatographie gefolgt von abschließender Mikrokristallisation während einer Dialyse gegen Puffersalzpuffer. Nach diesem Schritt liegt das reine Protein normalerweise durch Rücklösen des Niederschlags vor. Beim ersten Reinigungsschritt zeigte die Variante TGT W326E/E339Q noch das gewohnte Verhalten hinsichtlich der Affinität zu stationärer und mobiler Phase mit Gradienten hin zu Hochsalzbedingungen (siehe Abbildung 3.9 obere Zeile). Die Elution von der hydrophoben Säule war hingegen nicht wie gewohnt in vollem Umfang bei mittlerer Salzkonzentration möglich; es zeigte sich vielmehr, dass der Großteil des

3.3 Destabilisierung des Dimer-Interface: TGT W326E/E339Q

Proteins im Bereich des Niedersalzwaschpuffers am Ende der chromatographischen Aufreinigung zu finden war (Abbildung 3.9 untere Zeile).

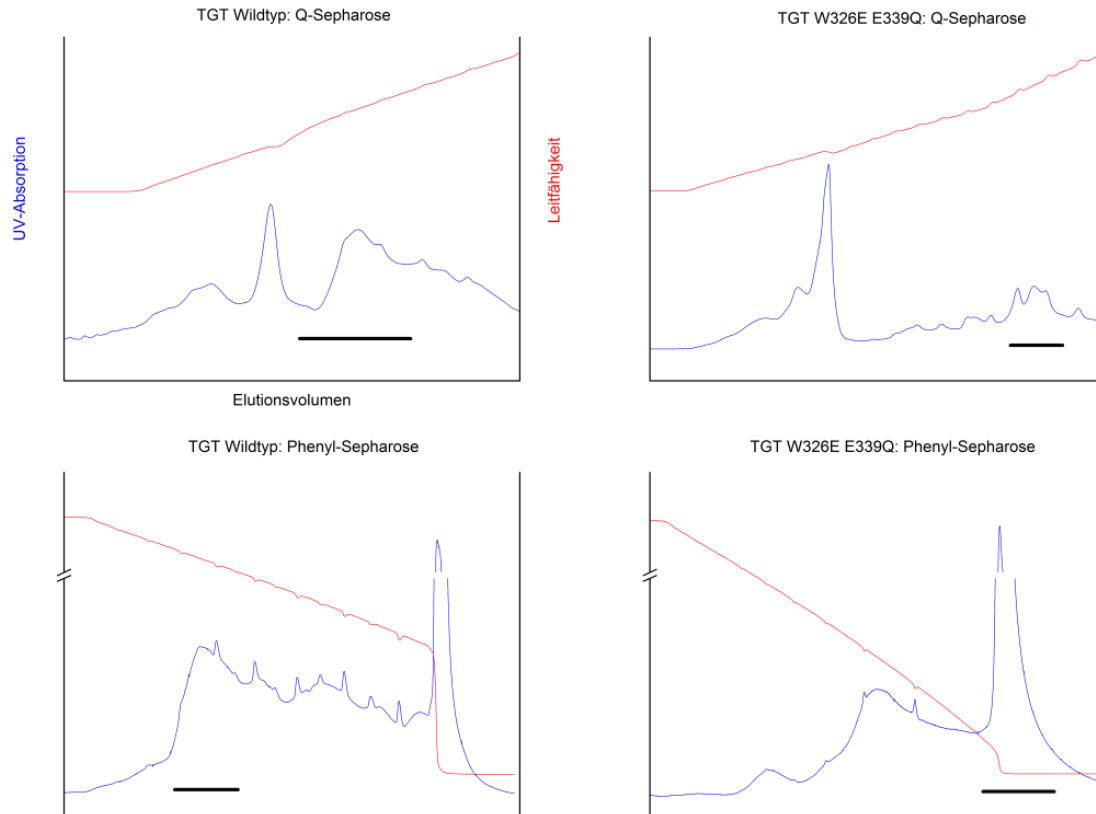


Abbildung 3.9: Darstellung der Elutionsdiagramme bei der Aufreinigung der Wildtyp TGT (links) im Vergleich zur Variante TGT W326E/E339Q (rechts). Aufgetragen ist die UV-Absorption in Abhängigkeit des Elutionsvolumens auf der Abszisse (blaue Kurve, proportional zur eluierten Proteinmenge) sowie die Leitfähigkeit (rote Kurve, korreliert mit der Salzkonzentration). Das Elutionsvolumen, in dem TGT auftritt, ist mittels eines schwarzen Balkens markiert (Nachweis erfolgte über SDS Gelelektrophorese). Die obere Zeile umfasst die Aufreinigung an Q-Sepharose (übereinstimmende TGT Elution für beide Varianten), die untere Zeile die Aufreinigung an Phenyl-Sepharose (Elution der TGT W326E/E339Q erst bei Nullkonzentration, TGT Wildtyp schon bei mittlerer Salzkonzentration).

Hier konnte erstmals ein deutlich anderes Verhalten einer veränderten Enzymvariante der TGT gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden. Trotz Einbringung einer hydrophilen Aminosäure wie Glutamat in die Region des *Interface* nahm die Affinität zur hydrophoben, stationären Phase deutlich zu. Dies lässt den Schluss zu, dass, wie auch immer geartete, strukturelle Änderungen am Protein vermehrt apolare Gruppen auf

der Oberfläche exponieren. Dies wäre dann der Fall, wenn statt des Dimers, das beim Wildtyp der TGT ausgebildet wird, die monomere Form bei der Doppelmutante TGT W326E/E339Q dominiert. Im Bereich des *Interface*, welcher in Folge einer Monomerisierung zugänglich wird, befinden sich mit 46.5% gegenüber 39.5% signifikant mehr apolare Aminosäuren an der Oberfläche als an der sonst exponierten Grenzfläche des Enzyms zum Solvens. Legt man weiterhin die für Wassermoleküle zugängliche Oberfläche am *Interface* zu Grunde (O und N als hydrophil mit 46.9%, C und S als hydrophob mit 53.1%), und vergleicht diese mit dem Dimer des Wildtypenzym (hydrophil 52.7%, hydrophob 47.3%), ist damit ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Affinität zur hydrophoben Oberfläche der Phenylsepharose erklärbar.

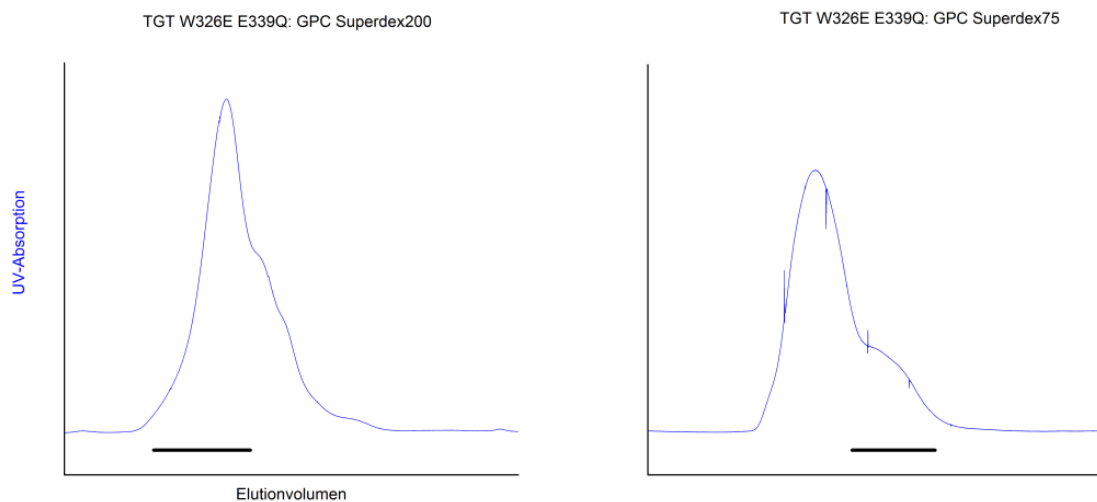


Abbildung 3.10: Aufreinigung von TGT W326E/E339Q über Größenausschlusschromatographie (GPC). Dargestellt ist die UV-Absorption in Abhängigkeit des Elutionsvolumens (blaue Kurve, proportional zur eluierten Proteinmenge). Es wurden zwei unterschiedliche Säulenmaterialien (Superdex200 und Superdex75) genutzt, um eine ausreichende Trennung zu gewährleisten.

Die Dialyse gegen Puffersalzpuffer wurde durch dieses Elutionsverhalten obsolet. Zur Abtrennung der übrigen Verunreinigungen wurde deshalb eine chromatographische Aufreinigung an einer Größenausschlussssäule gewählt. Um unspezifische Interaktionen zum Säulenmaterial zu vermeiden, wurde der Laufpuffer mit 150 mM NaCl versetzt. Die Probe wurde, um eine maximale Trennung zu erreichen, auf 1.5 mL aufkonzentriert. Aus einigen Fraktionen konnte so reines Protein gewonnen werden, auch wenn die

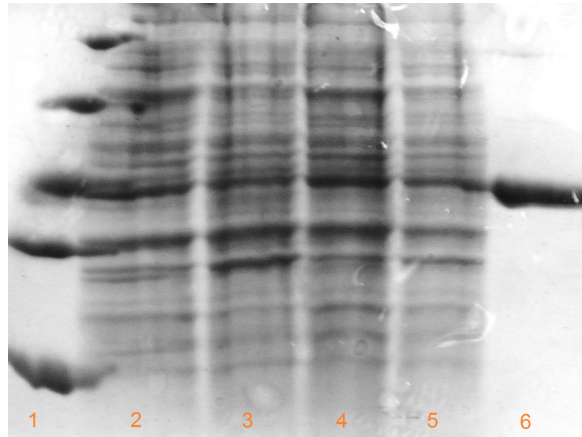


Abbildung 3.11: Vergleich der Produktion des Proteins TGT F92C/C158S/C281S: 1, Referenzmarker; 2, Vektor pASK-IBA13+ am Ende der Wachstumsphase vor Induktion; 3, Vektor pASK-IBA13+ nach Induktion mit $200 \mu\text{g L}^{-1}$ Anhydrotetracyclin, Inkubationszeit 15 h; 4, Vektor pPR-IBA2 vor Induktion am Ende der Wachstumsphase; 5, Vektor pPR-IBA2 nach Induktion mit 1 mM IPTG, Inkubationszeit 15 h; 6, Referenz TGT.

Gesamtausbeute mit lediglich 2 mg aus 4 L Zellkultur vergleichsweise gering ausfiel. Als Konsequenz aus den beschriebenen Beobachtungen war es notwendig, eine andere Reinigungsstrategie anzuwenden. Dabei war es wünschenswert, die erforderlichen Schritte bis zum sauberen Protein zu verringern. So wurde die Expression mit Hilfe eines neuen Vektors, der am N-Terminus die Sequenz eines Step-Tags II und einer Thrombin-Schnittstelle trägt, in Betracht gezogen. Um die Klonierung zu vereinfachen, wurde eine Totalsynthese des Gens, das für TGT W326E/E339Q kodiert, bei der Firma Geneart in Auftrag gegeben. Im Zuge dessen erfolgte eine Genoptimierung, bei der der GC-Gehalt angeglichen und die Verwendung vorteilhafter Codons für die Expression in *E.coli* angestrebt wurde. Schnittstellen relevanter Restriktionsenzyme innerhalb der Proteinsequenz wurden weitestgehend vermieden. Schließlich wurde das neue Gen in den Vektor pASK-IBA13+ kloniert und in *E.coli* Zellen des Typs BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL transformiert. Die Expression wird im Falle des pASK-Vektors nicht vom T7 System reguliert. Die Induktion erfolgt vielmehr mittels Anhydrotetracyclin. Laut Herstellerangaben kann dies zu einer um ca. 75% verminderten Ausbeute führen. [86] Zusammen mit Inna Schmidt und Manuel Neeb wurde deshalb zusätzlich der Vektor pPR-IBA2 getestet. Dieser verfügt über einen *lac*-Promotor und kann so mit dem T7 System induziert werden. Um das Protein analog mit einer Thrombinschnittstelle exprimieren zu können, wurde das gesamte Konstrukt aus Strep-Tag II, Schnittstelle und Protein mittels der Restriktionsenzyme *NheI* und *EcoRV* aus dem ursprünglichen

Vektor ausgeschnitten und, nach Entfernen des nicht benötigten Inserts, mittels T4 Ligase in den neuen Vektor eingefügt. Im Zuge einer Testexpression wurden die verschiedenen Expressionsvektoren in BL21CodonPlus(DE3)-RIPL Zellen verglichen. Dabei erfolgte nach der Anzucht einer Vorkultur die Aliquotierung der Expressionszellen nach dem OD₆₀₀ und deren Überführung in die Hauptkulturen, welche mit entsprechenden Antibiotika versetzt waren. Das Zellwachstum wurde beobachtet, nach 4 Stunden eine Probe entnommen und die Überexpression durch Zugabe von IPTG bzw. Anhydrotetracyclin gestartet. Nach weiteren 15 Stunden erfolgte erneut die Probenentnahme. Ein Vergleich der Ausbeuten erfolgte durch Analyse aliquotierter Zellmengen mittels SDS-Gelelektrophorese und ist in Abbildung 3.11 dargestellt (hier am Beispiel der TGT F92C/C158S/C281S). Leider konnte keine deutliche Verbesserung der produzierten Proteinmenge registriert werden. Weiterhin fällt auf, dass generell keine deutliche Überproduktion des Zielproteins nach Induktion der Zielgenexpression zu verzeichnen ist. Die Ursachen dafür sind bislang unklar, da die hier verwendeten Vektoren nach Herstellerangaben bisher erfolgreich in der eingesetzten Zelllinie getestet werden konnten, als auch die Gensequenz speziell auf den zur Expression verwendeten Zelltyp optimiert wurde. Die üblichen Ausbeuten von bis zu 10 mg je 4 L Bakterienkultur waren für die in dieser Arbeit genutzten Methoden ausreichend, jedoch sollte für Zwecke, die eine größere Proteinmenge erfordern, eine weitere Optimierung z.B. in Hinblick auf die verwendeten Expressionszellen oder den Vektor vorgenommen werden. Denkbar wäre eine Klonierung der Konstrukts aus Strep-Tag II, Linker, Schnittstelle und DNA-Sequenz der TGT in den ursprünglich verwendeten Vektor pET9d, der zu deutlich höheren Ausbeuten an Wildtyp-TGT führte.

Die Mutagenese weiterer TGT Varianten wurde mit dem neuen Quikchange Lightning Kit durchgeführt, wobei der Zeitbedarf dank der schnell arbeitenden Polymerase und DNase um nahezu einen Tag reduziert werden konnte. Es wurde pro Polymerasekettenreaktion jeweils nur eine Punktmutation durchgeführt und zunächst via Sequenzierung bestätigt, bevor u.Ü. die nächste Mutation für mehrfach veränderte Enzymvarianten eingeführt wurde. Alle erhaltenen Plasmide wurden zum Zwecke der Überexpression in *E.coli* Zellen des Typs BL21CodonPlus(DE3)-RIPL transformiert.

Unabhängig vom verwendeten Vektor wurde die Aufreinigung in drei Schritten vollzogen: Spezifische chromatographische Extraktion des Zielproteins mittels Bindung an Streptacin Fastflow Sepharose und Elution über einen Desthiobiotinpuffer, fraktionierte Reinigung an einer Größenausschlusssäule und abschließender Abspaltung des Tags

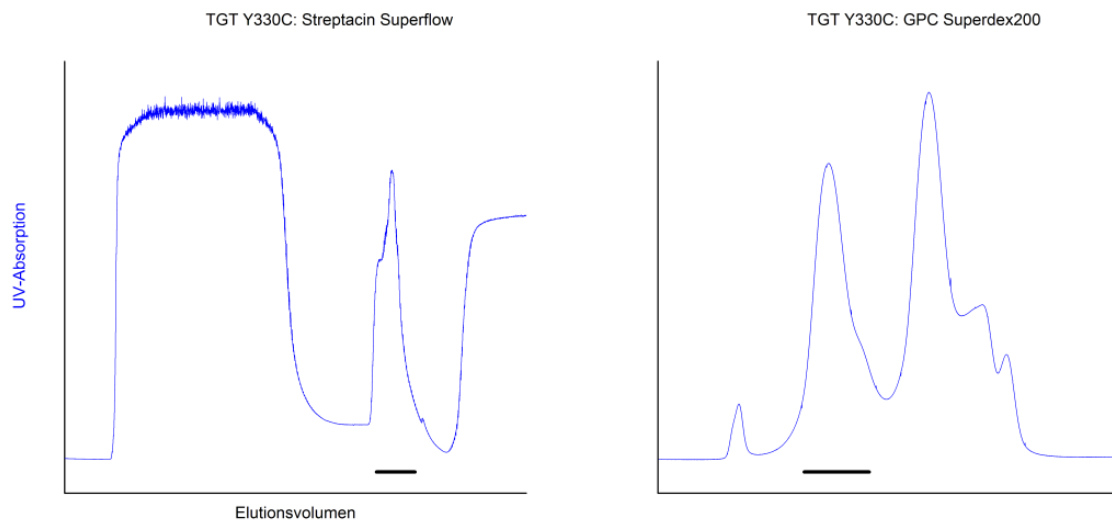


Abbildung 3.12: Aufreinigung von TGT Y330C über eine Strep-Tag spezifische Streptacin Chromatographie (linkes Elugramm, Elution mit Desthiobiotin) sowie eine anschließende Größenausschlusschromatographie (rechtes Elugramm, Superdex200). Dargestellt ist die UV-Absorption in Abhängigkeit des Elutionsvolumens (blaue Kurve, proportional zur eluierten Proteinmenge). Das Elutionsvolumen, welches TGT enthält, ist mittels eines schwarzen Balkens markiert (Nachweis erfolgte über SDS Gelelektrophorese).

über biotinyliertes Thrombin. Dabei wurden stets Puffer mit 150 mM NaCl verwendet, in dem das Protein eine ausreichende Löslichkeit bis zu Konzentrationen von 10 g L^{-1} zeigte. Eventuell störende Schwermetallionen wurden durch 1 mM EDTA maskiert. Für die Zellyse sowie die erste chromatographische Aufreinigung, bei der viele Proteine anwesend sind, wurden die Puffersubstanz TRIS mit einer Konzentration von 100 mM eingesetzt, ab dem zweiten Schritt wurde deren Konzentration auf 10 mM gesenkt. Der pH-Wert wurde konstant mit 8.5 eingestellt, was ca. 1.7 Einheiten oberhalb des isoelektrischen Punkts liegt, der mit ProtParam^[87] zu 6.85 berechnet wurde. So wurde eine gute Löslichkeit des Proteins sichergestellt. Bereits im ersten Schritt konnte durch eine spezifische Affinitätschromatographie, bei der das gesamte Lysat auf eine Streptacin Sepharose aufgetragen wurde, der Hauptteil der Verunreinigungen abgetrennt werden. Während das Zielprotein mit dem Säulenmaterial interagiert und zurückgehalten wird, sind die Verunreinigungen im Durchfluss zu finden. Unspezifisch wechselwirkende Proteine können durch Waschen mit Puffer entfernt werden, bevor schließlich das mit dem Strep-Tag II ausgerüstete Zielprotein über zugesetztes Desthiobiotin vom

Säulenmaterial verdrängt und in einem kleinen Volumen von etwa 15 mL eluiert wird (Abbildung 3.12 links).

Im zweiten Schritt wurde über eine Gelpermeationschromatographie das Zielprotein von noch verbliebenen Verunreinigungen abweichenden Molekulargewichts und eingesetztem Desthiobiotin getrennt. Dazu wurde die Probe auf etwa 2 mL aufkonzentriert, um eine möglichst hohe Auflösung und gute Trennung der einzelnen Fraktionen zu erhalten (Abbildung 3.12 rechts). Zur Identifikation der TGT wurden Proben der Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese charakterisiert. Abschließend erfolgte im dritten Schritt die Abtrennung des Strep-Tag II vom Protein durch Schnitt mit biotinyliertem Thrombin und batch-Adsorption an Streptacin-Sepharose, die wiederum abfiltriert werden konnte. Auf diese Weise wurden bis zu 10 mg TGT pro 4 L Zellkultur mit hoher Reinheit extrahiert. Durch die Schnittstelle verblieben allerdings am N-Terminus der TGT ein Glycin sowie ein Serin, sodass die molekulare Masse entsprechend der geänderten Sequenz berechnet werden musste. Die Bestimmung von Reinheit und Identität der einzelnen TGT Varianten erfolgte über denaturierende Massenspektroskopie (HPLC-ESI-MS, siehe Anhang B).

Molekularbiologische Charakterisierung

Die angefertigte Variante W326E/E339Q der TGT wurde auf ihren Oligomerisierungsgrad hin überprüft sowie deren biologische Funktionalität untersucht. Aus den Vorarbeiten von Ritschel et al. ^[39] und Stengl et al. ^[60] ist die Beobachtung von verminderter Aktivität der enzymatischen Katalyse bei gleichzeitigem Rückgang der Dimerisierung der Proteins bekannt. Es war nun Ziel, diese These weiter zu stützen und den Monomerisierungsgrad zu erhöhen.

Zur Bestimmung des Monomer/Dimer-Verhältnisses wurden zunächst zwei Verfahren eingesetzt: die analytische chromatographische Trennung nach dem Molekulargewicht (*Size Exclusion Chromatography* - SEC) an einem Superdex 200 Gel und die Bestimmung in einem Flugzeit-Massenspektrometer mit weicher Ionisierung über eine nano-Elektrospryanlage. Beide Techniken bieten jeweils Vorteile, die sich gegenseitig ergänzen. So kann das massenspektroskopische Experiment mit geringen Probenmengen durchgeführt werden und liefert bei externer Kalibrierung sehr genaue Masseangaben hinsichtlich der detektierbaren Agglomerate. Allerdings bedarf es einer Probenaufbereitung durch einen Umpufferungsschritt hin zu einer vollständig evaporierbaren Zusammensetzung. Instabile Proteine könnten hierbei denaturieren, was allerdings bei

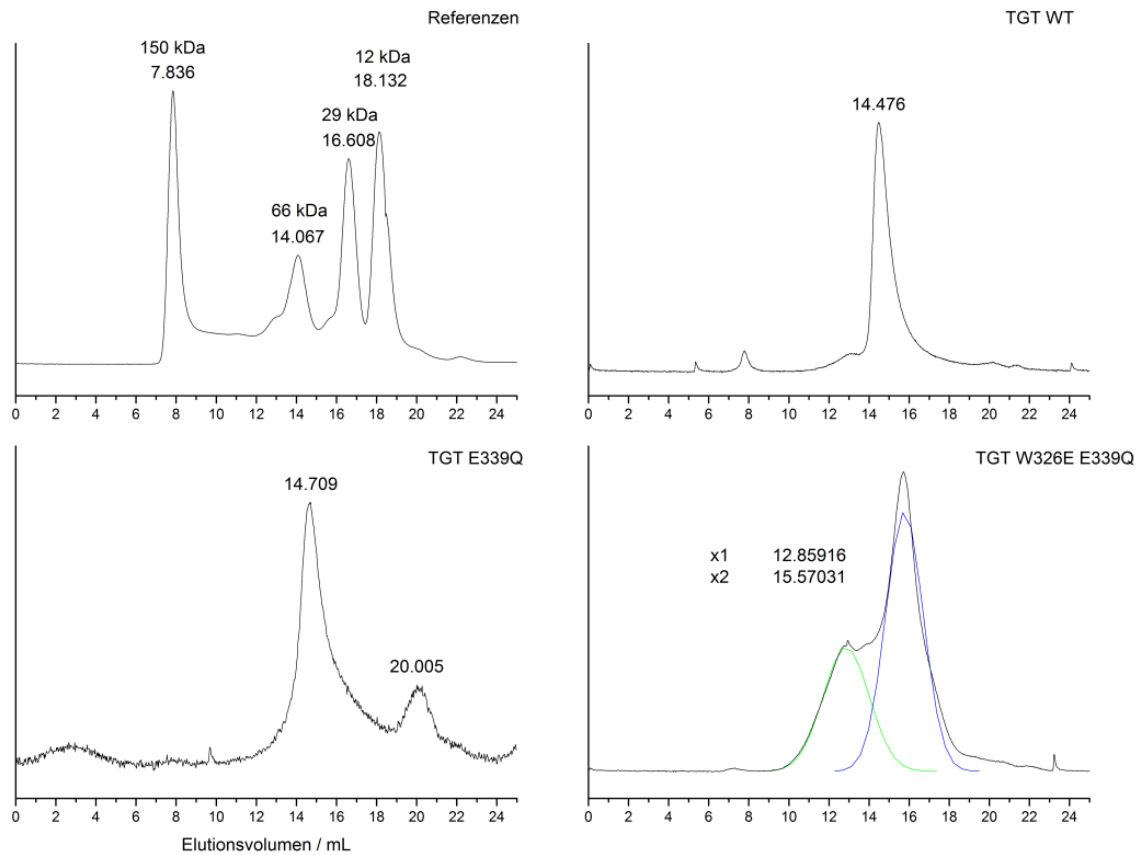


Abbildung 3.13: Analytische Größenausschlusschromatographie (SEC) verschiedener TGT Varianten sowie einer Referenz aus Alkohol Dehydrogenase 150 kDa, Albumin 66 kDa, Carboanhydrase 29 kDa und Cytochrom C 12 kDa. Die Auftrennung erfolgt gemäß des reziproken Molekulargewichts. Aufgetragen ist die UV-Absorption (proportional zur eluierten Proteinmenge) in Abhängigkeit der Elutionszeit. Monomodale Verteilungen bei ca. 14.5 mL zeigen TGT Dimer, die bimodale Verteilung bei TGT W326E/E339Q ein Monomer/Dimer-Gemisch an.

TGT nicht beobachtet wurde. Die Qualität der erhaltenen Spektren hängt stark von der Vollständigkeit des Pufferaustauschs ab (zu nativer MS siehe auch Heck et al. [35]). Die Größenausschlusschromatographie kommt hingegen ohne vorherigen Pufferaustausch aus, da alle in dieser Arbeit untersuchten Proben bereits in einem geeigneten Puffer vorlagen. Allerdings ist das Trennverhalten nicht nur vom Molekulargewicht abhängig: Unspezifische Affinität zum Säulenmaterial sowie Wechselwirkungen der Probenbestandteile untereinander können zu Fehlinterpretationen führen. Deshalb ist diese Methode eher als relatives Vergleichsverfahren gegenüber einer bekannten Probe, hier des TGT-Wildtypproteins, anzuwenden. Vorteilhaft ist jedoch die deutlich höhere

Konzentration mit der die Proteinprobe aufgetragen werden kann, sodass eine Aussage im Konzentrationsbereich der Kristallisationsbedingungen gemacht werden kann.

Abbildung 3.13 zeigt die Elutionsdiagramme der Variante TGT W326E/E339Q, des TGT Wildtyps sowie einer Vergleichsvariante TGT E339Q und der externen Kalibrierung. In Bezug auf die zu erwartende Peaklage würde das Referenzprotein 2 (Albumin 66 kDa) TGT Dimer (ca. 86 kDa) und Monomer (ca. 43 kDa) voneinander trennen, sodass man dimeres Protein bei kleiner 14 mL und solches in monomerer Form bei größer 14 mL erwarten würde. TGT Wildtyp eluiert jedoch bei 14.5 mL mit einem signifikant größeren Volumen, als dies für das Dimer anhand der externen Säulenkalibrierung zu erwarten wäre (ähnliches wurde durch Reuter et al. beobachtet ^[62]). Aus Untersuchungen von Ritschel et al. ^[39] ist jedoch zweifelsfrei bekannt, dass es sich dabei um ein Dimer mit dem Molekulargewicht von etwa 86 kDa handelt. Deshalb wird im Folgenden auf diese Peaklage von 14.5 mL für das Dimer Bezug genommen. Die Variante TGT W326E/E339Q zeigt abweichend vom Wildtyp keine monomodale, sondern eine bimodale Verteilung. Da mittels SDS-Gelelektrophorese und denaturierender Massenspektrometrie die Reinheit der Probe zuvor verifiziert worden war, müssen die beiden Peaks zwangsläufig aus zwei nebeneinander vorliegenden oligomeren Zuständen der TGT resultieren, wobei das Flächenverhältnis etwa 1:2 entspricht. Die Peaklagen bei 12.9 mL und 15.6 mL decken sich nicht mit den Beobachtungen beim TGT Wildtyp. Allerdings ist das Trennungsverhalten der Säule im beobachteten Molekulargewichtsbereich nicht ausreichend hoch, sodass von einer gegenseitigen Beeinflussung der beiden Formen Monomer und Dimer hinsichtlich des Elutionsvolumens ausgegangen werden muss. Der Peak bei 12.9 mL sollte dem Dimer entsprechen, da höhere Oligomerisierungsgrade bisher nicht festgestellt wurden. Der zweite Peak bei 15.6 mL sollte dann die monomere Form repräsentieren. Dieses Experiment zeigte erstmals, dass TGT durch das Einführen von Punktmutationen in hohem Maße monomerisiert werden kann. Die entscheidende Verbindungsstelle repräsentiert Tryptophan 326, da die Untersuchung der Variante E339Q keine Verschiebung der Peaklage zeigt. Vielmehr wird analog zum Wildtyp die Peaklage bei 14.7 mL gefunden. Ein kleiner Peak bei 20.0 mL ist auf nachgewiesene Verunreinigungen zurückzuführen.

Eine weitere Vergleichsmöglichkeit bietet die Variante TGT K52M, welche ebenfalls von Ritschel et al. umfassend charakterisiert wurde. ^[39,68] In massenspektroskopischen Untersuchungen wurde dort das Enzym fast ausschließlich in seiner dimeren Form gefunden. Lediglich bei geringeren Konzentrationen traten Spuren des Monomers auf.

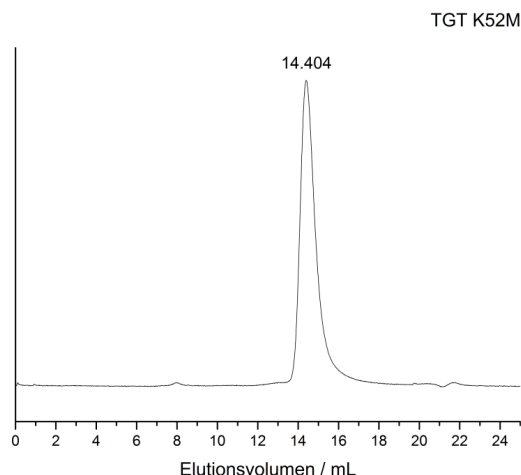


Abbildung 3.14: Analytische Größenausschlusschromatographie (SEC) der TGT Variante K52M. Die Auftrennung erfolgt gemäß dem reziproken Molekulargewicht. Aufgetragen ist die UV-Absorption (proportional zur eluierten Proteinmenge) in Abhängigkeit der Elutionszeit. Die monomodale Verteilung bei ca. 14.5 mL zeigt TGT Dimer an.

Das Elutionsdiagramm für diese Variante ist in Abbildung 3.14 dargestellt und weist mit 14.4 mL etwa die gleiche Peaklage auf wie der Wildtyp und die Variante TGT E339Q. Diese Beobachtung liegt im erwarteten Bereich, da Glu339 und Lys52' im Wildtyp regelmäßig eine Salzbrücke bilden und durch diese zwei Mutationen folglich dieselbe Wechselwirkung adressiert wird (vgl. Abbildung 3.1).

Die Methode der nicht denaturierenden nano-ESI Massenspektrometrie fand ebenfalls Anwendung bei der Charakterisierung der neu exprimierten Proteinvariante TGT W326E/E339Q und wurde am *Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (LSMBO)* durchgeführt. Aus früheren Untersuchungen an TGT ist eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit des Oligomerisierungsgrades bekannt. Danach treten bei niedrigeren Konzentrationen, z.B. 1 μM , eher Anteile des Monomers auf, als bei hoher Konzentration, z.B. 10 μM .^[39,68] Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Bestimmungen bei einer Proteinkonzentration von 10 μM bezogen auf monomere TGT durchgeführt.

Die doppelt mutierte Variante zeigt zwei Signalsätze, wobei mit einem Flächenanteil von etwa 90% die Masse des Monomers inklusive eines gebundenen Zinkions signifikant überwiegt. TGT Wildtyp wie auch die Variante TGT K52M zeigten bei vorangegangenen Untersuchungen unter den gleichen Bedingungen praktisch ausschließlich das

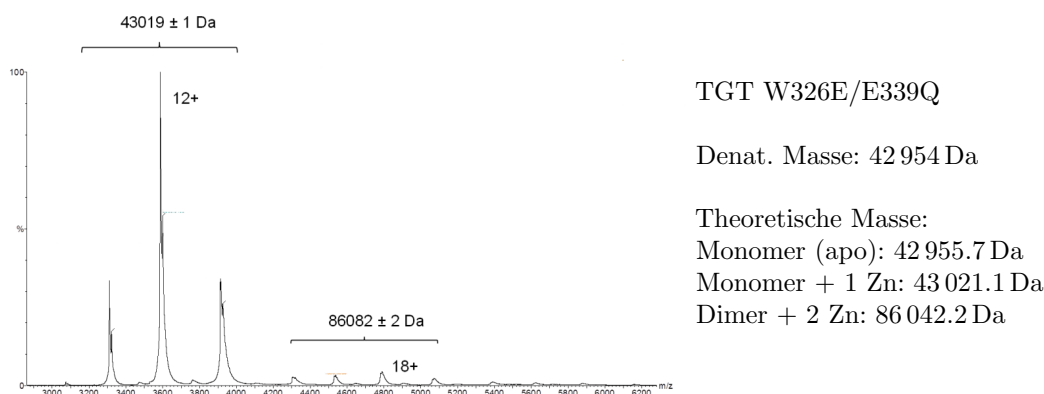


Abbildung 3.15: Native Massenspektrometrie an TGT W326E/E339Q (10 mM in Ammoniumacetatpuffer). Aufgetragen ist das Spektrum im Rohformat mit aus externem Standard ermittelten Masse-zu-Ladungsverhältnis auf der Abszisse. Die Rekonstruktion der Masse ist über dem jeweiligen Multipllett angegeben. Zum größten Teil liegt TGT W326E/E339Q als Monomer mit einem gebundenen Zinkion vor. Die theoretische Masse wurde durch ProtParam [87] an Hand der Peptidsequenz berechnet.

dimerisierte Protein. Die Beobachtungen der nativen Massenspektrometrie korrespondieren somit mit den oben vorgestellten Gelfiltrationsexperimenten. Die neu eingefügten Veränderungen sind folglich für den Monomerisierungseffekt maßgeblich.

Der Nachweis einer signifikanten Verringerung des funktionalen TGT Dimers zugunsten des inaktiven Monomers durch die instrumentellen Methoden lässt auch einen Einfluss auf die katalytische Aktivität vermuten. In Tabelle 3.2 sind die *in vitro* Assaydaten des TGT katalysierten Austauschs der Base Guanin in tRNA gegen ^3H -Guanin für einige relevante Varianten sowie den Wildtyp aufgeführt.

Gegenüber dem Wildtyp ist der Umsatz, charakterisiert durch k_{cat} , für die weitgehend monomerisierte Variante TGT W326E/E339Q ca. um den Faktor 20 reduziert, während die Substrataffinität zu tRNA, gekennzeichnet durch K_{M} , unverändert bleibt. Dies entspricht der Erwartung, da der Anteil des dimer vorliegenden Katalysators zwar gesenkt, die Substraterkennungstasche jedoch nicht verändert wurde. Anders hingegen ist die Situation bei der Variante TGT K52M, bei der durch die Mutagenese die an der Bindung zur tRNA beteiligte Aminosäure 52 verändert wurde (K52 bildet dort eine *Stacking* zu U35, siehe dazu Abbildungen 3b & 5c in Xie et al. [55]). Zwar ist der Einfluss auf die Umsatzrate mit Faktor 50 drastischer als durch die hochgradige Monomerisierung bei TGT W326E/E339Q, allerdings wird in gleichem Maße die Affinität zur tRNA um den Faktor 5 gesenkt. Zum Vergleich bietet sich deshalb die substrataffinitätsspezifische Wechselzahl bzgl. tRNA an, die beim TGT Monomer um den Faktor 20, bei der K52M Variante um den Faktor 10 erniedrigt ist.

Tabelle 3.2: Relevante enzymkinetische Parameter hinsichtlich des Umsatzes von tRNA als Substrat durch TGT W326E/E339Q.

Mutationen	k_{cat} [$10^{-2}s^{-1}$]	K_M [μM]	$\frac{k_{cat}}{K_M}$ [$10^4 L \cdot mol^{-1} \cdot s^{-1}$]
TGT Wildtyp	1.2	4.8	0.25
TGT K52M	0.023 ^[39]	0.98 ^[39]	0.023
TGT W326E/E339Q	0.055	4.7	0.012

Kristallographische Charakterisierung

Zur genaueren Aufklärung der Auswirkungen auf den Katalyseprozess sowie für die rationale, strukturbasierte Entwicklung eines Protein-Protein-*Interface*-Liganden ist die weitgehende Aufklärung der Struktur einer monomeren Form der TGT von Bedeutung. Deshalb wurde versucht, die Variante W326E/E339Q zu kristallisieren. Für die Kristallisation kam letztendlich eine geringfügig geänderte Proteinvariante zur Anwendung, bei der zusätzlich die Cysteine 158 und 281 jeweils gegen Serin ersetzt wurden, ohne dass sich daraus strukturelle oder funktionale Änderungen im Enzym ergeben. Die für den Wildtyp etablierten Bedingungen ^[39,60,63] führten jedoch nicht zur Kristallisation. Dies ist insofern nicht verwunderlich, da das Protein durch den weitgehend monomeren Zustand andere Löslichkeitseigenschaften aufweist und zudem bzw. gerade deshalb in einem Puffer mit weniger als einem Zehntel der sonst üblichen Salzkonzentration vorliegt (vgl. auch Affinitätsverhalten zu Phenyl-Sepharose in Abbildung 3.9). Um eine spontane Kristallisation zu erreichen, wurden etwa 1250 Bedingungen mit Hilfe eines Roboters pipettiert und über einen Zeitraum von mehreren Wochen kontrolliert. Dabei wurden rhomboedrische Kristalle in vielen Bedingungen mit mittlerem Gehalt an Polyethylenglycol unterschiedlichen Molekulargewichts beobachtet. Schließlich wurde ein Kristall der Bedingung PACT51 (20% PEG 3350, 0.2 mol L^{-1} Natriumjodid) für die Röntgenstrukturanalyse ausgewählt. Die Datensammlung am BESSY II mit Synchrotronstrahlung ergab einen Datensatz mit einer Auflösung von 1.55 \AA (pdb-Code: 3UVI). Die damit aufgeklärte Struktur wird weiter unten erläutert.

Eine vergleichende Gegenüberstellung mit der Variante TGT K52M (bereits publizierte Daten mit pdb-Code 3HFY) wurde als zielführend angesehen. Da die von Ritschel et al. bestimmte Struktur jedoch in wichtigen Bereichen keine ausreichend definierte Elektronendichte aufweist, wurde diese unter Veränderung der Kristallisationsbedingungen erneut charakterisiert, um eine zuverlässigere Strukturaufklärung zu ermöglichen. Kristalle hoher Qualität wurden durch Anpassung des pH-Wertes auf 8.5 mittels

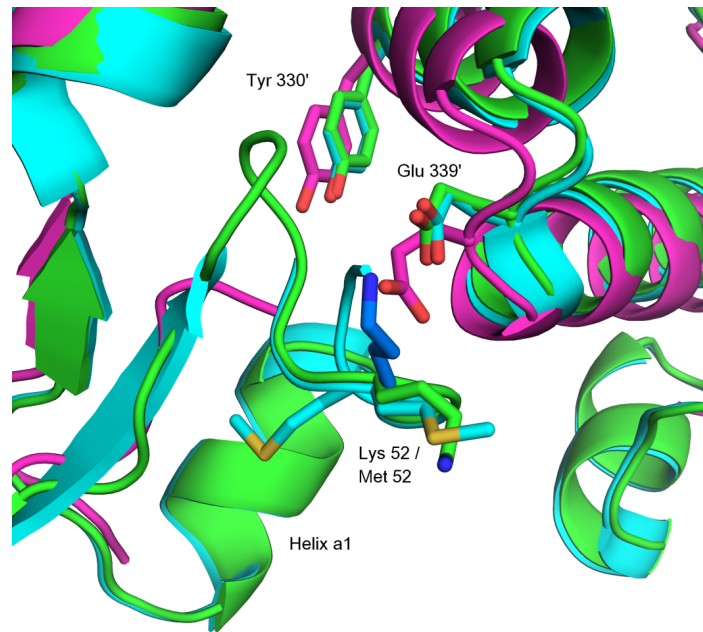


Abbildung 3.16: Vergleich der Loop-Konformationen hinsichtlich der Mutation K52M. Dargestellt sind der Wildtyp - 1PUD (grün), TGT K52M - 3HFY von 2009 (rosa) und TGT K52M - 4DXX von 2012 (cyan). Während in der rosa angefärbten Struktur weite Teile eines Loops (Aminosäuren 46 bis 52) sowie der sich anschließenden Helix $\alpha 1$ fehlen, sind in 4DXX (cyan) zwei Konformationen charakterisiert, von denen eine dem Wildtypverlauf folgt, die andere eine abweichende Geometrie einnimmt. In blau ist Lys52 aus 2Z7K gezeigt.

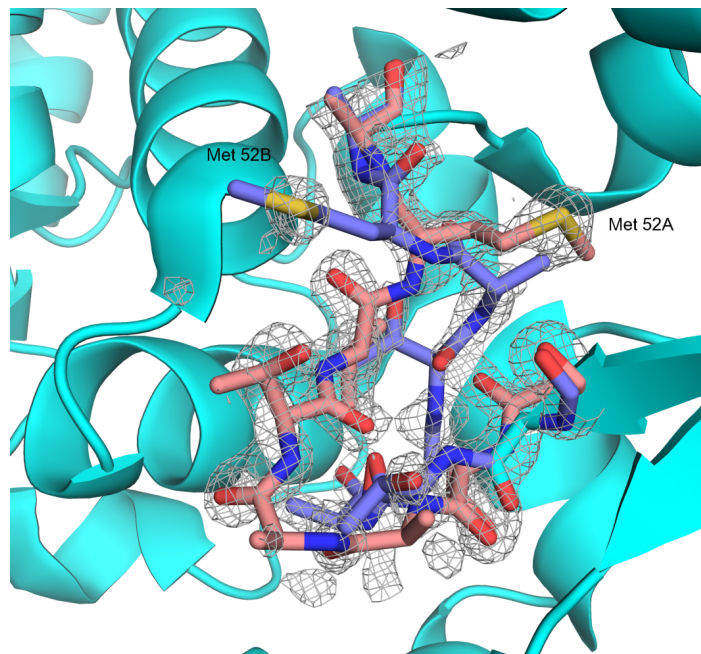


Abbildung 3.17: Verlauf des Loops 46 bis 52 in TGT K52M - 4DXX (cyan) in beiden Konformationen (stick-Modell, blau dem Wildtyp folgend, rosa abweichender Verlauf) in die 2Fo-Fc-Elektronendichtekarte (Level 3σ , graues Netz) eingebettet. Met52 zeigt dabei in zwei nahezu entgegengesetzte Richtungen (rosa: Konformation A, blau: Konformation B) und bedingt so den unterschiedlichen Loop-Verlauf.

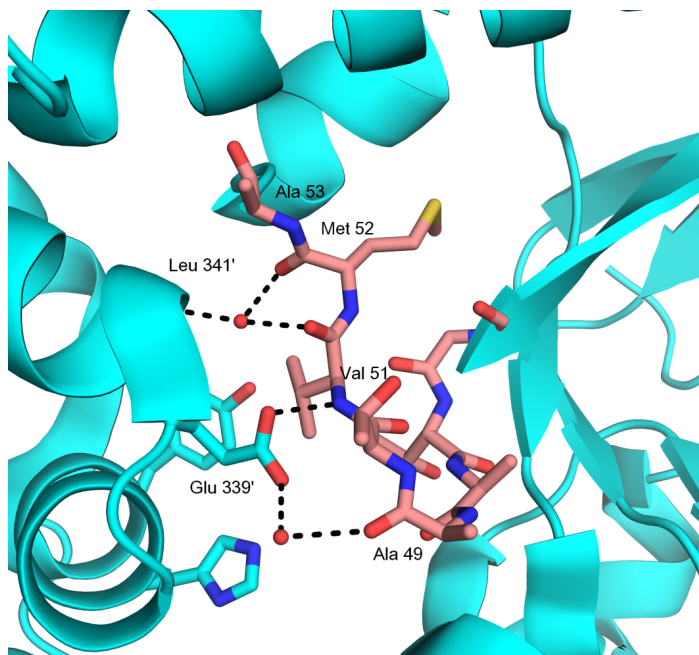


Abbildung 3.18: Darstellung der Interaktionen von Loop-Konformation A in 4DXX zum Homodimer-partner: direkte Wechselwirkung Val51-Glu339' 2.5 Å, Wasser-vermittelte H-Brücken Ala49-H₂O-Glu339' 2.9 Å bzw. 2.4 Å und Val51/Met52-H₂O-Leu341' 2.5 Å/2.7 Å bzw. 2.9 Å.

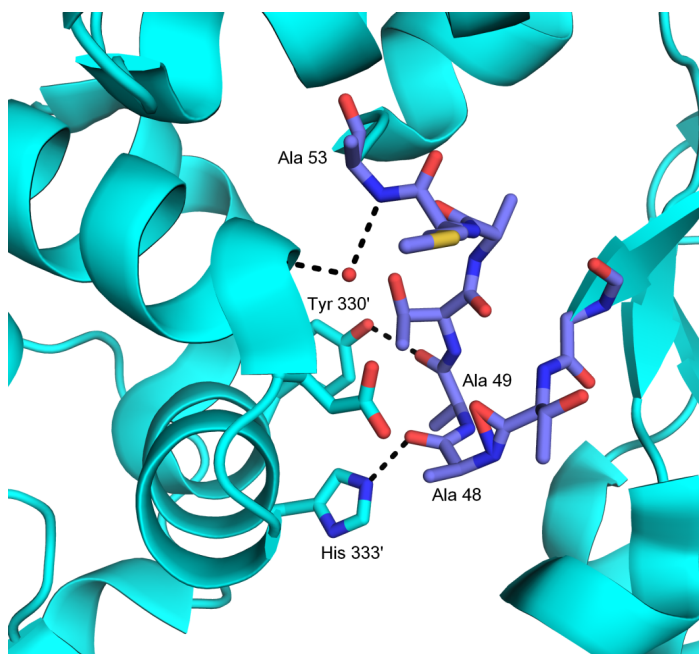


Abbildung 3.19: Darstellung der Interaktionen von Loop-Konformation B in 4DXX zum Homodimer-partner: direkte Wechselwirkungen Ala49-Tyr330' 2.4 Å und Ala48-His333' 2.5 Å, Wasser-vermittelte H-Brücke Ala53-H₂O-Leu341' 3.0 Å bzw. 2.9 Å.

0.1 mol L⁻¹ TRIS sowie des PEG8000 Gehalts auf 12% unter Beibehaltung von 10% DMSO erhalten, wobei zusätzlich die Zusammensetzung des Tropfens im *sitting-drop* Verfahren auf 2 µL Proteinlösung und 1 µL des Kristallisationspuffers verändert wurde. Bei der Datensammlung am Synchrotron BESSY II konnte eine Auflösung von 1.66 Å erzielt werden (pdb-Code: 4DXX).

Analog zu den bisherigen Erkenntnissen kristallisiert die Variante TGT K52M in der für den Wildtyp üblichen Raumgruppe C2 mit einer Polypeptidkette pro asymmetrischer Einheit. Die Zellkonstanten sind weitgehend identisch mit Abweichungen von max. 2%. Durch Ergänzung der symmetrieäquivalenten Moleküle gemäß der Kristallsymmetrie ergibt sich das funktionale Dimer unter Ausbildung des untersuchten Protein-Protein-*Interface*. Im Gegensatz zur zuvor gelösten Struktur gelang es bei der Reproduktion nahezu alle Aminosäuren im PPI-Bereich eindeutig zu identifizieren und zu verfeinern. Lediglich die zwei Alaninreste 48 und 49 weisen eine zu schlecht definierte Elektronendichte für die eindeutige Zuordnung auf. So konnten nun ebenfalls strukturelle Informationen über den Sequenzbereich 50 bis 62 ermittelt werden (Abbildung 3.16). Dabei wurde deutlich, dass die Helix $\alpha 1$ gegenüber dem Wildtyp an unveränderter Position zu liegen kommt. Der Schleifenbereich zwischen 46 und 52 nimmt hingegen zwei verschiedene Konformationen ein: Mit einer Besetzung von 54% überwiegt die vom Wildtyp abweichende Konformation gegenüber einem dem Wildtyp entsprechenden Verlauf, der mit 46% verfeinert wurde. Die Helices $\alpha E'$ und $\alpha F'$ und damit auch die Aminosäuren Tyr330' und Glu339' bleiben im Gegensatz zur Struktur 3HFY in einer dem Wildtyp analogen Position. Die mutierte Aminosäure 52 liegt als Methionin zu einem Teil in einer dem Lysin ähnlichen Konformation vor. Bemerkenswerter Weise bildet Lys52 die Bindung zum anderen Monomer nur in 2/3 der in der Proteindatenbank hinterlegten Strukturen aus (vgl. Abbildung 3.1 sowie beispielhaft die blaue Darstellung in Abbildung 3.16 aus 2Z7K), im anderen Teil wird eine Ausrichtung hin zu Thr285 bevorzugt (in Abbildung 3.16 beispielhaft in dunkler Darstellung aus 1PUD). Eben in dieser zweiten Konformation kommt Met52 in 46% der Fälle so zu liegen, dass der Verlauf des sich anschließenden Loops dem der Wildtypstruktur entspricht. Als treibende Kraft ist eine schwache induzierte Dipol-Interaktion zu Thr285 bei einem Abstand von 3.4 Å wahrscheinlich. Zu 56% nimmt Met52 jedoch eine Position ein, die in der Struktur des Wildtyps von Val51 besetzt wird, und bildet in Folge dessen hydrophobe Wechselwirkungen zu Pro44, Val59 und Ile351 aus. Die dafür erforderliche Positionsänderung von Val51 führt schließlich zum geänderten Loop-Verlauf.

Zur näheren Analyse der verschiedenen Loop-Konformationen wurden Ala48 und Ala49 in die verbleibende, geringe Restelektronendichte eingepasst (Abbildung 3.17). Bei Betrachtung der Abbildungen 3.18 und 3.19 wird deutlich, dass die Lage der zwei Konformationen durch gerichtete Wasserstoffbrückenbindungen zum Dimerpartner stabilisiert wird. Direkte Kontakte werden entweder analog zum Wildtyp zwischen Tyr330' sowie His 333' zu Ala48 und Ala49 (Abbildung 3.19 Konformation B) oder aber zwischen Glu339' und den Hauptkettenatomen von Val51 ausgebildet (Abbildung 3.18 Konformation A). Hinzu kommen vermutlich schwächere, durch Wassermoleküle vermittelte Kontakte zwischen dem Loop-Backbone und der Helix $\alpha F'$.

In Ergänzung zur bereits beschriebenen Struktur kann festgestellt werden, dass die von Ritschel et al. ^[39] diskutierte Flexibilität sich offenbar auf den Bereich der Aminosäuren 46 bis 52 beschränkt. Durch Änderung der Kristallisationsbedingungen konnten Kristalle höherer Qualität und damit besser aufgelösten Strukturmerkmalen erhalten werden. Die Dimerisierung scheint hiervon jedoch nicht deutlich beeinflusst zu sein, da beide Loop-Konformationen Kontakte zum anderen Dimerpartner ausbilden und damit zur Stabilisierung des Protein-Protein-Kontakts beitragen. Auf der Seite des anderen Monomers konnten keinerlei Veränderungen durch die Mutation K52M beobachtet werden. Dabei handelt es sich um die Aminosäure Glu339, die sich an der Spitze eingebettet zwischen zwei starren helikalen Strukturelementen befindet. ^[101]

Obwohl durch Massenspektroskopie überwiegend die monomere Form der Variante TGT W326E/E339Q bzw. TGT C158S/C281S/W326E/E339Q nachgewiesen wurde, wurde die Lösung ihrer Kristallstruktur in der Raumgruppe C2 mit analoger Geometrie zu den bisher bekannten Strukturen der TGT erhalten (pdb-Code: 3UVI). Das funktionale Dimer ergibt sich somit auch hier durch Anfügen eines Symmetrieäquivalents. Weite Teile des Proteins sind darin deckungsgleich mit den bekannten Wildtypstrukturen. Allerdings können in den Bereichen der zwei Punktmutationen signifikante Unterschiede festgestellt werden. Der Austausch W326E führt zu einer Verringerung der Raumanforderung der an dieser Position befindlichen Aminosäure. Dieser Umstand wird jedoch nicht durch Umfaltung des gebundenen Dimerpartners sondern durch Einlagerung von sechs zusätzlichen Wassermolekülen in die Struktur kompensiert (Entfernung 2.6 Å bis 3.1 Å), wobei zwei dieser Wassermoleküle eine Wasserstoffbrückenbindung an die Hauptkettencarbonylsauerstoffatome von Phe92' (3.4 Å) und Met93' (2.9 Å) ausbilden (Abbildung 3.20 sowie Abbildung 3.21 für den Vergleich zum Wildtyp). Ein direkter Kontakt zwischen den zwei Monomeren wäre allein schon aus Sicht der Ladungen bzw.

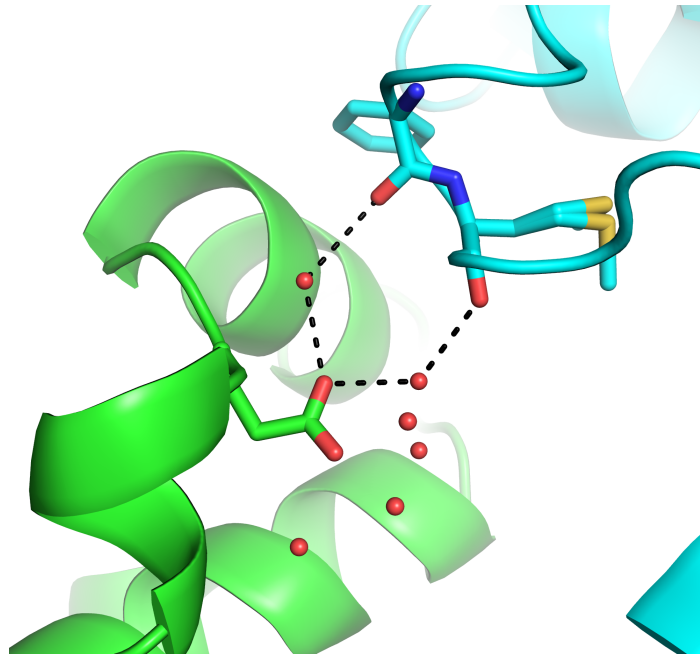


Abbildung 3.20: Ausschnitt aus TGT C158S/C281S/W326E/E339Q - 3UVI mit der mutierten Aminosäure Glu326 direkt umgeben von 6 Wassermolekülen im Abstand $2.6 \text{ \AA} \dots 3.1 \text{ \AA}$. Zwei dieser Wassermoleküle bilden Brücken zum Homodimerpartner an Phe92' und Met93' aus (Abstände $2.7 \text{ \AA} \dots 3.4 \text{ \AA}$).

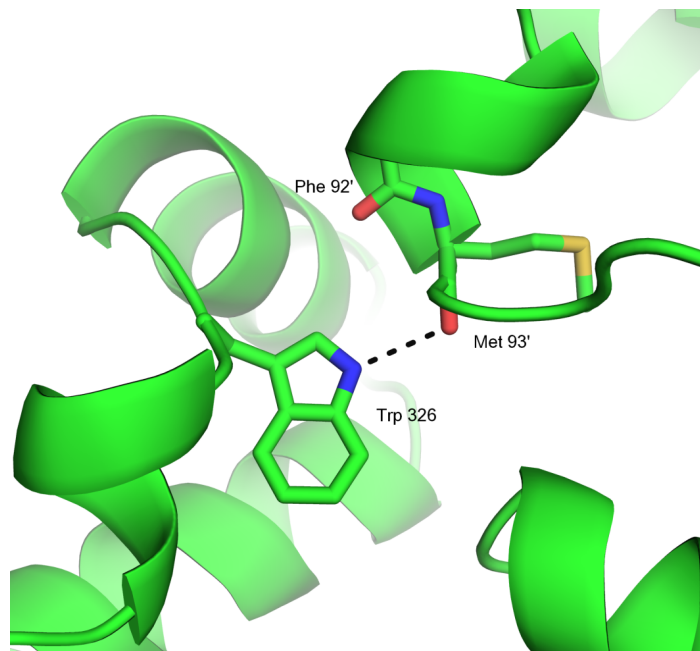


Abbildung 3.21: Detailansicht aus TGT Wildtyp - 1PUD: Trp326 bildet eine direkte Wasserstoffbrückenbindung zu Met93' mit einem Abstand von 3.0 \AA aus. Kein äquivalentes Wassermolekül zu denen in 3UVI ist vorhanden.

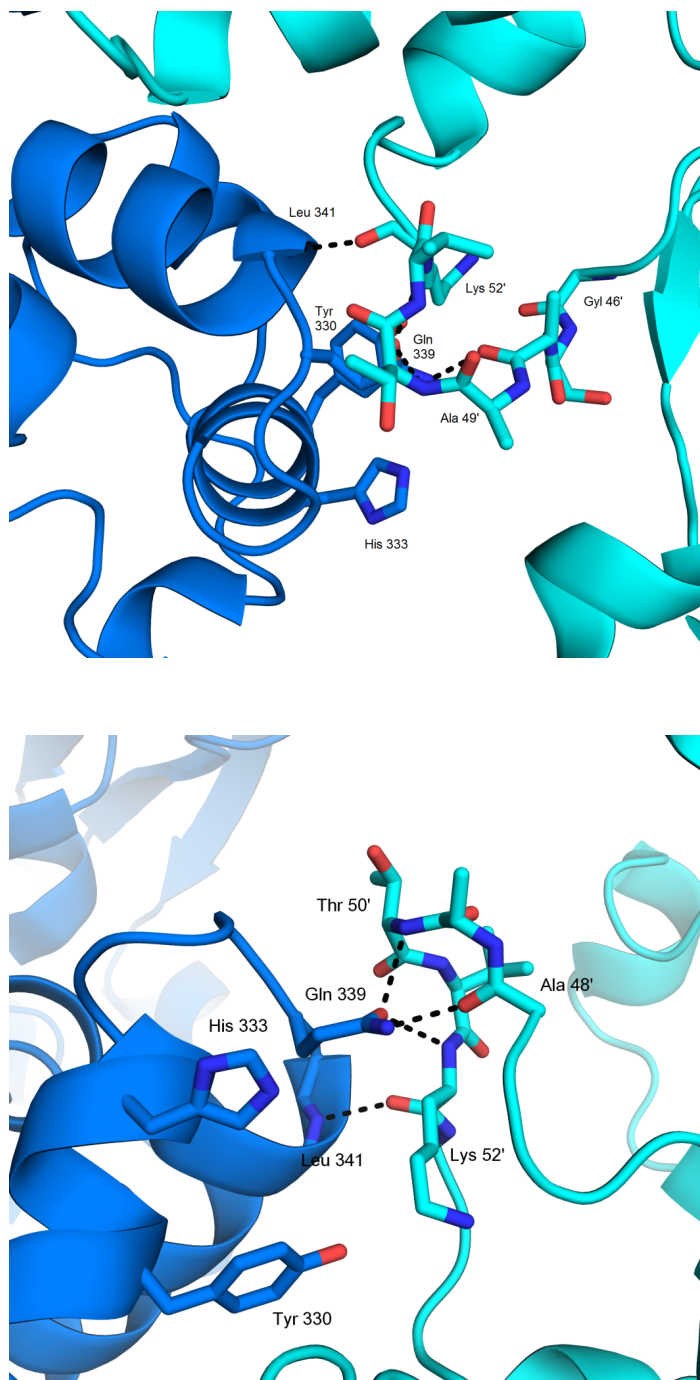


Abbildung 3.22: Darstellung der Interaktionen des Loop 46' bis 52' in TGT C158S/C281S/W326E/E339Q - 3UVI zum Homodimerpartner. **Oben:** Es wurde die gleiche Orientierung wie in Abbildungen 3.18, 3.19 sowie 3.23 gewählt. Dabei werden durch den geänderten räumlichen Verlauf die wesentlichen Interaktionen verdeckt. **Unten:** in einer anderen Orientierung werden die direkten Wechselwirkungen Lys52' - Leu341 2.8 Å, Lys52' - Gln339 3.0 Å, Thr50' - Gln339 3.0 Å, Ala48' - Gln339 2.6 Å sichtbar.

Polarisierungen nur dann möglich, wenn es zu einer lokalen Umfaltung käme. Auffällig ist zum zweiten, dass in Analogie zur bisher einzig bekannten Struktur einer am *Interface* veränderten Variante (TGT K52M) der Loop-Bereich der Aminosäuren 46 bis 52 eine geänderte Konformation einnimmt, die bei der gegebenen Auflösung von 1.55 Å mit 100% verfeinert werden konnte. Der Verlauf weicht noch mehr vom typischen Verlauf im Wildtyp ab, als dies bei K52M der Fall ist. Daraus resultiert ein völlig neu geordnetes Interaktionsmuster zwischen den beiden Monomeren in diesem Bereich des Dimerkontakts (Abbildung 3.22): Die Seitenkette der zu Glutamin mutierten Aminosäure 339 stabilisiert die Lage des Loops gleich dreifach durch zwei H-Brückenbindungen vom Sauerstoff der Seitenkette zu zwei Amidstickstoffatomen von Thr50' und Lys52' (jeweils 3.0 Å) sowie einer Bindung vom Carboxamidstickstoff zum Carbonylsauerstoffatom von Ala48' (2.6 Å). Außerdem sitzt die Carbonylgruppe von Lys52' so in Verlängerung der Helix α F, dass eine starke Wasserstoffbrückenbindung durch die Richtungspolarisierung entlang der helicalen Achse ausgebildet werden kann (2.8 Å zu Leu341).

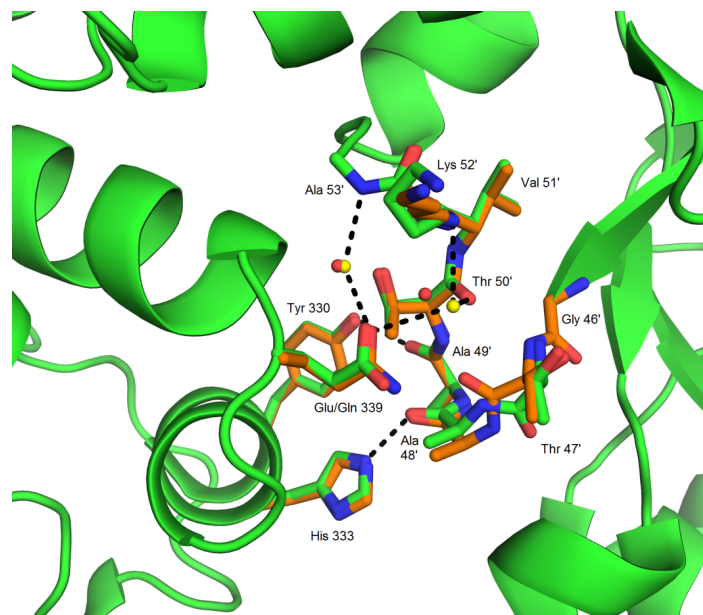


Abbildung 3.23: Darstellung der Interaktionen des Loop 46' bis 52' in TGT E339Q - 3UNT (orange) im Vergleich zum Wildtyp - 1PUD (grün). Direkte Wechselwirkungen werden identisch ausgebildet: Ala48' - His333 2.7 Å, Ala49' - Tyr330 2.6 Å. Die Mutation E339Q hat lediglich geringe Auswirkungen auf die Positionierung von Wassermolekülen in zwei Brücken (rot 1PUD, gelb 3UNT): Thr50'/Lys52' - H₂O - Gln339 3.0 Å/3.3 Å und 3.2 Å, Ala53' - H₂O - Gln339 3.0 Å und 2.9 Å.

Inwiefern die Mutation an Position 339 einen entscheidenden Einfluss auf diese Loop-Konformation nimmt, konnte nur an Hand einer Struktur der Einzelmutter TGT E339Q aufgeklärt werden. nanoESI-MS Messungen ergaben auf Grund von Verunreinigungen kein geeignetes Spektrum. Die Geometrie der mit einer Auflösung von 1.80 Å gelösten Struktur (pdb-Code: 3UNT) weist die beschriebene Abweichung vom Wildtyp nicht auf, alle Aminosäuren im entsprechenden Bereich liegen nahezu deckungsgleich (Abbildung 3.23). Lediglich eines der vermittelnden Wassermoleküle ist leicht verschoben und ermöglicht so eine Bindung an die Carbonylgruppe der Hauptkette von Thr50'. Verschiebung und Bindungsausbildung sind durch den Wegfall der Ladung sowie durch die mögliche Rotation innerhalb der terminalen Carboxamidgruppe der Glutaminsäurekette an Position 339 zu erklären. Die Veränderung von Glu zu Gln begünstigt somit zwar die Interaktionen zwischen den einzelnen Monomeren in der Kristallpackung bei geändertem Loop-Verlauf in der Doppelmutter W326E/E339Q (3UVI), ist selbst jedoch nicht für die strukturelle Auslenkung aus der Wildtypkonformation ursächlich. Die zur Kristallisation von TGT C158S/C281S/W326E/E339Q genutzten Bedingungen wurden neu etabliert und enthalten das bis dato nicht eingesetzte Salz Natriumjodid. In der Proteinstruktur kann an zehn Positionen ein Jodidion identifiziert werden, wobei die Besetzung sich an zwei Stellen durch Positionierung an einer speziellen Lage auf einer Symmetrieachse gegenseitig bedingt (jeweils auf 50% Population verfeinert) und an allen anderen Plätzen mit 34% bis 65% verfeinert wurde. Sie befinden sich bis auf zwei Ausnahmen an der Außenseite des Proteins in leicht zugänglichen Bereichen, sodass es unwahrscheinlich erscheint, dass diese Jodidionen funktionsentscheidende Taschen besetzen. Die zwei übrigen befinden sich in unmittelbarer Umgebung des Loop 46 bis 52. Dies unterstreicht zum einen die Notwendigkeit der Jodidionen als wichtiges Additiv für die Kristallisation, gibt aber auch dazu Anlass, die beobachtete Struktur zu einem gewissen Grad als Spezifikum der Kristallisationsbedingungen zu werten. Die Packung der eigentlich in Lösung monomerisierten Variante TGT W326E/E339Q als kristallographisches Dimer im Festkörper, die mit dieser Geometrie der des funktionellen Dimers des Wildtyps entspricht, könnte durch eine sehr günstige Kristallpackung bedingt sein, die eine optimale, energie günstige und gleichzeitig kompakte Anordnung der TGT-Moleküle ermöglicht. Die Additive würden dann diese Anordnung im Kristallgitter zusätzlich stabilisieren (vgl. die Diskussion in 3.4).

Durch die Veränderungen im Bereich 46 bis 52 kommt es zu einer partiellen Umgestaltung der Protein-Protein-Kontaktfläche und dem Auftreten einer flachen Kavität

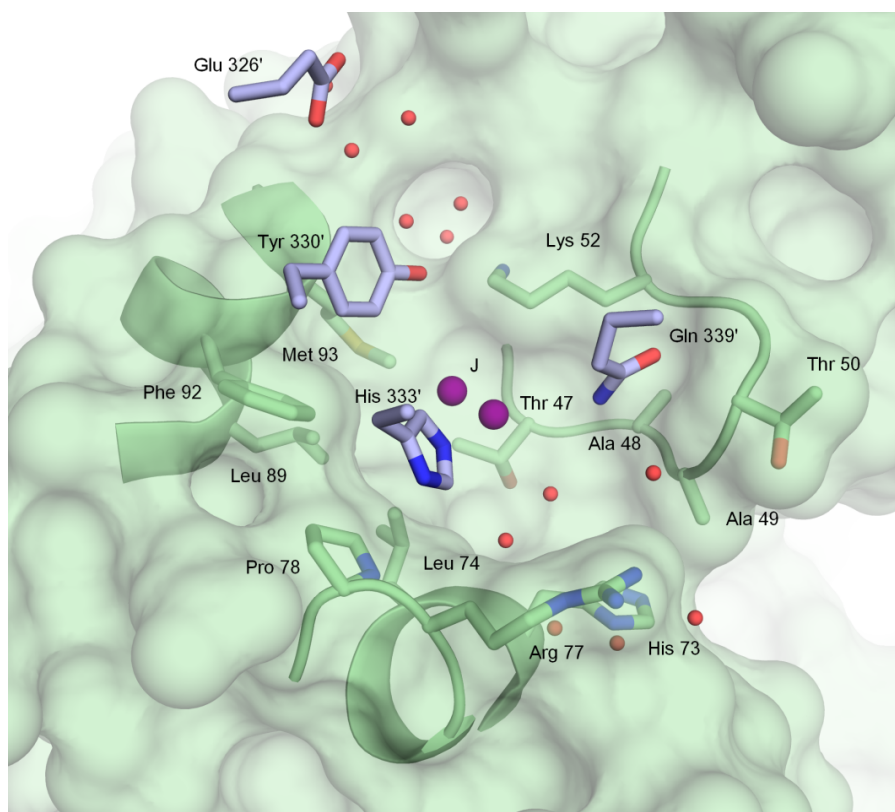


Abbildung 3.24: Detail einer in TGT C158S/C281S/W326E/E339Q - 3UVI erstmalig aufgetretenen Kavität (Oberfläche halbtransparent in grün) im *Interface*-Bereich des Homodimers. Gebildet wird diese hauptsächlich durch die Aminosäuren Thr47, Ala48, Ala49, Thr50, Lys52 (als Teile einer Schleife), His73, Leu74, Arg77, Pro78 (als Teile einer Helix), Leu89, Phe92, Met93 (als Teile einer Helix) und ist mit einem ungeordneten Iodidion auf zwei möglichen Positionen (violett) sowie zwei unabhängigen Wasserclustern mit jeweils sechs Mitgliedern gefüllt. Zusätzlich ragt aus dem anderen Monomer (blau) die Aminosäure His333' in die Tasche. Tyr330' sowie Glu326' und Gln 339' befinden sich in unmittelbarer Nähe.

(Abbildung 3.24), die durch ein in zwei Lagen disloziertes Jodidion sowie einen Cluster von sechs Wassermolekülen besetzt wird. Im Grenzbereich zur exponierten Oberfläche finden sich die Aminosäuren Glu326', Tyr330', His333' sowie Gln339' des Dimerpartners sowie weitere sechs Wassermoleküle. Die Eignung dieser Tasche für weitere Untersuchungen in Hinblick auf den Entwurf eines Inhibitors zum Blockieren der Protein-Protein-Kontaktbildung wird in einem späteren Teil dieser Arbeit diskutiert und wurde zudem in Ansätzen experimentell untersucht (siehe Kapitel 3.7).

3.4 Diskussion I: Identifikation treibender Kräfte der TGT Dimerisierung

Zunächst soll genauer auf die Methodik der Hot-Spot Detektion eingegangen werden. In der Literatur wurden zahlreiche Methoden beschrieben, um die Bindeeigenschaften von Aminosäuren an Protein-Protein-*Interfaces* zu klassifizieren und zu quantifizieren. Dabei kamen zum einen wissensbasierte Ansätze auf Basis entweder struktureller oder auch entwicklungsgeschichtlicher Daten zum Einsatz, zum anderen wurden Verfahren zur Energieabschätzung entwickelt. Dabei ist es zunächst einmal unerheblich, ob ein vorhandenes *Interface* klassifiziert wird oder aber ein Vorhersagemodell in Bezug auf eventuelle Ausbildung eines Komplexes das Ziel der Untersuchungen darstellt.^[102] In Bezug auf den vertretbaren Aufwand besonders in Hinblick auf die zur Verfügung stehenden Rechenkapazitäten müssen jedoch immer dann Abstriche bei Detailinformationen gemacht werden, wenn der Untersuchungsgegenstand umfangreich ist. So ist ein genomweites PPI-*Docking/Scoring* mit anderen Maßstäben zu betrachten als die genaue Analyse eines einzelnen PP-Komplexes hinsichtlich der Hot-Spot-Verteilung. Nichtsdestotrotz stellen wegen des großen Aufwands eines experimentellen Alanin-Scans Computermethoden wie z.B. die Molekulardynamik eine Alternative dar, um erste Einblicke in die stabilisierenden Beiträge einzelner Aminosäuren zu erhalten. Massova und Kollman berichteten als erste von einem *Computational Alanine Scanning*.^[103] Dabei wurden jeweils separate Simulationen für *in silico* Alaninmutanten durchgeführt und die Differenz der Systemenergien mit dem Bindungsbeitrag der durch Alanin ersetzten Aminosäureseitenkette korreliert. Eine schnellere, auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Variante ist es, die Energiedifferenz zwischen dissoziiertem und assoziiertem Zustand für jede Aminosäure einzeln zu berechnen und die dazu benötigten Strukturdaten aus nur einer Simulation des Komplexes zu entnehmen. Die damit erzielbaren Ergebnisse sind stark abhängig von den genutzten Rechenmodellen bzw. den angewendeten Parametern.^[104] Um ein umfassendes Bild der Bindungseinflüsse zu gewinnen, wäre es in der Tat notwendig, neben enthalpischen auch entropische Anteile zu berechnen. Für Entropieabschätzungen müssen die Systeme auf sehr langen Zeitskalen simuliert werden, um alle relevanten Konfigurationen ausreichend zu berücksichtigen, sodass ihre Anteile an der Zustandssumme durch ein entsprechendes Modell (Normalmodenanalyse oder quasiharmonische Analyse) erfasst werden können.^[104] Gerade bei großen Systemen mit einigen tausend Atomen ist dies durch die zur Verfügung

stehende Rechenkapazität kaum zu gewährleisten. Höchstwahrscheinlich ist das Solvens in die Betrachtungen mit aufzunehmen – hier haben sich sowohl implizite als auch explizite Methoden auf ihre Art und Weise bewährt –, was den Rechenaufwand weiter vergrößern wird. ^[100]

Im Abschnitt oben wurde auf die MMPBSA Methode, die in AMBER 11 implementiert ist, zurückgegriffen. Dabei wurden die optimierten Parameter von Gohlke et al. ^[43] genutzt. Die Abschätzung der einzelnen Energiebeiträge gilt als relatives Maß für die Bindungsenergie und dient der Klassifikation der beteiligten Aminosäuren, um so einen Ansatzpunkt für experimentelle Untersuchungen zu finden. Die Methode wurde zudem durch weitere Informationen sowohl aus der Simulation, welche explizit das Lösungsmittelverhalten mit abbildet, als auch durch statistische Auswertungen der Aminosäurekontakte einer Vielzahl von TGT-Kristallstrukturen sowie Erkenntnisse aus der Literatur unterstützt. Diese vielfältige Bewertungsgrundlage und die durchgeführten Validierungsberechnungen bildeten die wichtigsten Elemente für die erfolgreiche Auswahl einer geeigneten Mutationsstelle.

Mit dem Ergebnis der weitgehenden Monomerisierung durch die Mutation an den Positionen 326 und 339 formt sich nun ein grundlegendes Bild der Dimerisierungsbestrebung des untersuchten TGT Enzymkomplexes, das nachfolgend diskutiert und eingeordnet werden soll. Durch die native nano-ESI Massenspektrometrie und die Gelfiltrationsexperimente konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass ein Großteil des Proteins in Lösung als Monomer vorliegt, während die strukturelle Charakterisierung mittels Röntgenstrukturanalyse im Kristallgitter weiterhin ein Homodimer analog zu den bekannten Wildtypstrukturen abbildet. Dabei besteht durchaus die Möglichkeit, dass es sich dabei um ein kristallographisch erzwungenes Dimer handelt. Die Konzentration des Enzyms ist bei der Kristallisation im Bereich von 90 μM und im Kristall lokal weit höher anzusiedeln. Vergleicht man mit den Messungen der Massenspektrometrie (10 μM), so wäre es bei einem konzentrationsabhängigen Dimerisierungsgleichgewicht durchaus denkbar, dass eine Verschiebung in Richtung Dimer erfolgt. Vermutlich wird durch eine optimale Kristallpackung mit zwei benachbarten Molekülen auf einer zweizähligen Achse das Dimer deutlich besser stabilisiert, als sich dies für separate Monomere in einer völlig anderen Packung ergeben würde. Dies würde über das betrachtete Protein-Protein-*Interface* hinaus ganz andere Packungskontakte erfordern. Vielfach wird in der Literatur die mögliche Unterscheidung zwischen ‚echten‘ und ‚kristallographisch bedingten‘ Proteinkomplexen erörtert. ^[105–108] Viele Methoden benutzen z.B. den Anteil

des *Interface* an der Proteinoberfläche, Komplementäranalysen hinsichtlich Ladung, Hydrophobizität und Oberflächengestalt oder auch die Häufigkeit bestimmter Sekundärstrukturmerkmale und der beteiligten Aminosäuren. Etabliert hat sich seit der Vereinheitlichung des PDB-Formats die PISA Software (*Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies*)^[97], die durch einen physikalisch-thermodynamischen Ansatz versucht, gegebene makromolekulare Interaktionen zu bewerten. Vergleicht man jedoch die Vorhersagen dieser Methode für den Wildtyp (1PUD) und die kristallisierte Variante TGT C158S/C281S/W326E/E339Q (3UVI), so fallen diese mit ΔG von $-16.7 \text{ kcal mol}^{-1}$ und $-15.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ nahezu identisch aus und lassen eine Unterscheidung nicht zu. Die Einbeziehung einer *Hot-Spot*-Funktionalität ist mit diesem Programm nicht möglich. Umso wichtiger erscheint es in diesem Zusammenhang Aussagen über die Quartärstruktur in Lösung zu ermitteln. Deshalb wurden in den hier vorgestellten Analysen konsequent unter Zuhilfenahme der nativen nano-ESI Massenspektrometrie Informationen über den strukturellen Aufbau in Lösung bestimmt.

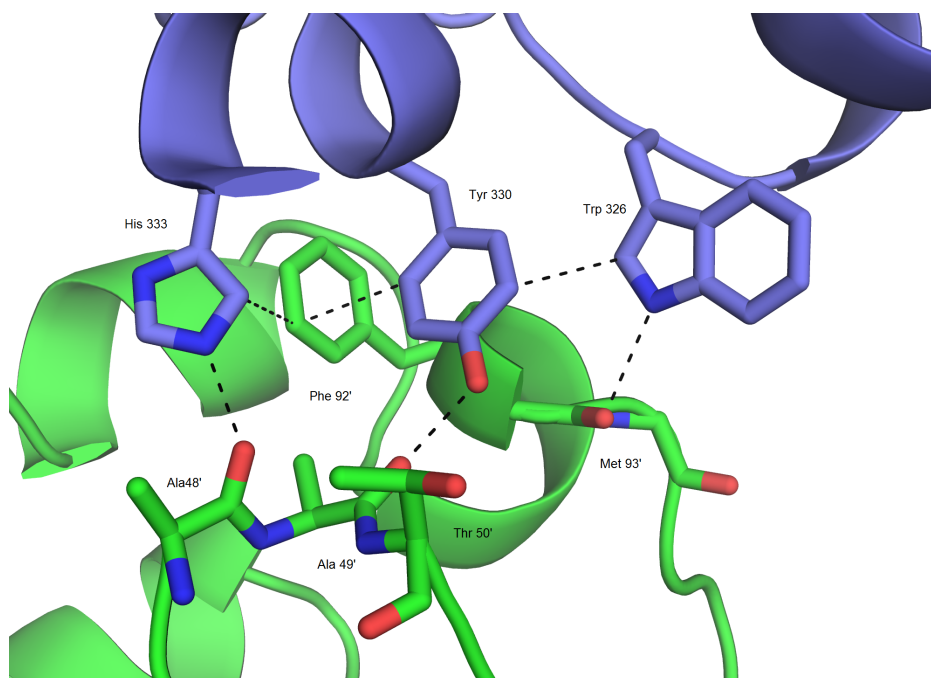


Abbildung 3.25: Netzwerk der aromatischen Aminosäuren Trp326, Tyr330, Phe92' und His333 am *Interface* des TGT Wildtyp Enzyms - 1PUD (Monomere in blau und grün). Durch aromatische Interaktionen bilden diese einen Cluster (Abstände Trp326 - Tyr330 ca. 5.5 \AA , Tyr330 - Phe92' ca. 5.0 \AA , Phe92' - His333 ca. 5.3 \AA , His333 - Tyr330 ca. 6.2 \AA), über Wasserstoffbrückenbindungen wird der Enzymkomplex stabilisiert (Abstände Trp326 - Met93' 3.0 \AA , Tyr330 - Ala49' 2.6 \AA , His333 - Ala48' 2.7 \AA).

Der Ersatz von Tryptophan gegen Glutamat ändert grundlegend das Eigenschaftsprofil in einem der wichtigen *Hot-Spot*-Bereiche der Proteinoberfläche. Zum einen wird durch die repulsiven Wechselwirkungen der zwei Akzeptorfunktionalitäten die zuvor bestehende Bindungsaffinität signifikant herabgesetzt, zum anderen zeigt die Strukturbestimmung der Mutante (3UVI) deutlich den erhöhten Solvatationsgrad an Glu326. Dieses ist von sechs zusätzlichen Wassermolekülen umgeben. Die Integration von Wasser in Bereiche von Protein-Protein-Wechselwirkungen ist durch verschiedene Aufgaben der Moleküle gekennzeichnet: Sie können Bindungen überbrücken, lediglich an einen der Partner binden oder ohne spezifische Interaktion in das *Interface* aufgenommen werden. Während für den ersten Fall eine stabilisierende Wirkung anzunehmen ist, sollte der sonstige Beitrag von in das *Interface* aufgenommenen Wassermolekülen zur Protein-Protein-Interaktion eher destabilisierend sein.^[109] Der Ausschluss von Wasser ist somit ein Beitrag zur Stabilisierung der makromolekularen Komplexbildung, der durch Freisetzung der vormals geordneten Wassermoleküle der Hydrathülle in die umgebende Wasserphase entropisch günstig sein sollte.^[30] Der Nachweis von Wassermolekülen im Bereich des *Interface* allein erscheint daher nicht ausreichend, sondern vielmehr muss auch die lokale Umgebung in die Betrachtung einbezogen werden. Hier befinden sich die hydrophoben Aminosäuren Val322, Tyr330, Leu341, Leu345, Pro56' sowie die Methylengruppen von Lys55'. Dem geordneten Wassercluster um Glu326 bieten sich daher keine Möglichkeiten zur Ausbildung von weiteren H-Brücken an das Protein, sodass die einzelnen Moleküle schlechter solvatisiert sind, als wenn sie sich frei in Lösung befänden. Beim Wildtyp wird diese hydrophobe Kavität mit Tryptophan optimal ausgefüllt und die Möglichkeit zur Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen ausgenutzt.

Der zweite Effekt berührt die aromatische Eigenschaft des Tryptophanrests. Aromatisches *Stacking* ist eine der allgemein akzeptierten signifikant stabilisierenden Wechselwirkungen bei der Proteinfaltung und in Protein-Protein-*Interfaces* (siehe dazu [110–113]). Ebenso konnte aus der Simulation der Wildtyp TGT eine überproportional hohe Stabilisierung durch die aromatischen Aminosäuren berechnet werden. Abbildung 3.8 zeigt außerdem deren geometrische Stabilität über die in der MD simulierte Zeit. Analysiert man deren Verteilung nicht nur auf der Oberfläche der einzelnen Monomere, sondern berücksichtigt deren Erweiterung durch die Komplexbildung, so ergibt sich ein Cluster der Aminosäuren Trp326, Tyr330, Phe92' sowie His333, an dem beide Monomere beteiligt sind (Abbildung 3.25). Den Kriterien von Espinoza-Fonseca^[112] folgend, bil-

den die Partner untereinander durch wechselseitiges *Stacking* ein Netzwerk, sodass zusätzliche kooperative Effekte der Stabilisierung zu erwarten sind. Ihre Positionierung ist zudem so, dass die enthaltenen H-Brücken-Donorfunktionen an His333, Tyr330 und W326 optimal auf Akzeptorfunktionen ausgerichtet sind und sich zu einem Netzwerk zusammenfügen. Mit dem Wegfall von Trp326 durch Mutation zu Glu326 in 3UVI bleiben die anderen Partner zwar bei der Dimerbildung untereinander in Kontakt, das kooperierende Netzwerk von Interaktionspartnern wird jedoch geschwächt. Diese Argumentation geht auch mit den Berechnungen bei Espinoza-Fonseca^[112] einher, der für 80% aller untersuchten Tryptophanseitenketten in π - π -Wechselwirkungen eine Stabilisierungsenergie von mehr als 4 kcal mol⁻¹ feststellte. Ähnlich große Auswirkungen sind im Fall der TGT durch den Austausch der Reste Phe92' oder Tyr330 zu erwarten, da hierdurch das Netzwerk massiv gestört bzw. unterbrochen würde.

Neben diesen, im folgenden Abschnitt noch zu vertiefenden Einblicken in die Triebkräfte der Dimerisierung der TGT, konnten Hinweise auf strukturelle Unterschiede zwischen der dimeren Komplexform und der isolierten Monomerform gewonnen werden. So ist der weitgehende Erhalt der Tertiärstruktur durchaus beachtlich und Änderungen scheinen sich auf den Schleifenbereich zwischen den Aminosäuren 46 und 62 zu beschränken. Die Helix α 1 zeichnet sich durch hohe Stabilität aus. Auf Grund der Kristallpackung bzw. der Ausbildung eines zweizähligen kristallographischen Dimers im Kristallverband konnte sich eine uneingeschränkte Beweglichkeit in der Struktur der Doppelmutante W326E/E339Q (3UVI) noch nicht ausbilden. Es ist daher schwer einzuschätzen, welche strukturellen Eigenschaften der am *Interface* beteiligte Loop unter den Bedingungen eines ungestörten Monomers besitzt und ob sich eine Geometrie ergibt, die das Design eines spezifischen Inhibitors zum Stören des Protein-Protein-Kontakts erlaubt. Neueste Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass dieser Bereich beim TGT-Monomer wahrscheinlich ungeordnet vorliegt und zur Ausbildung des Dimers geordnet wird, es sei denn, durch eingebrachte Liganden wird dieses Motiv gezwungenermaßen in einem ungeordneten Zustand gehalten.^[101] Sollte es weiterhin möglich sein, ein kleines Molekül so zu positionieren, dass der Loop in einer für die Dimerisierung nicht geeigneten Konformation stabilisiert wird, wäre der Durchbruch hin zu einer neuen Leitstruktur zum Blockieren der Funktion der TGT möglich.

3.5 Destabilisierung eines aromatischen Clusters: TGT F92C/C158S/C281S, TGT Y330C, TGT Y330D

Im vorangegangenen Abschnitt wurden Überlegungen hinsichtlich der besonderen Beteiligung aromatischer Aminosäuren am *Interface* der TGT in Bezug auf die Dimerisierung diskutiert. In diesem Abschnitt soll die Hypothese verfolgt werden, ob TGT Varianten durch Austausch der aromatischen Funktionalitäten an den Positionen 92 und 330 in Richtung eines vermehrten Auftretens des Monomers destabilisiert werden können. Dabei werden ganz analog die genetische Veränderung der codierenden Plasmide, die Expression aus *E.coli* sowie eine umfassende Charakterisierung der TGT Varianten durch native nano-ESI Massenspektrometrie, einen biochemischen *in vitro* Assay sowie die Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen zum Einsatz kommen.

Ausgehend von diesen Überlegungen wurde zunächst Phe92 gegen Cys ausgetauscht. Zum einen sollte dadurch konservativ vorgegangen werden, indem eine nicht geladene Aminosäure verwendet wird. Zum anderen erfolgte der Austausch gegen Cys mit Blick auf ein chemisches *Tethering* von Liganden mit Thiolgruppen, um die durch die Mutation W326E entstandene Kavität auszuleuchten (zum *Tethering*-Verfahren siehe Kapitel 3.7). Um ein Reagieren an anderen Cysteinen des Enzyms zu verhindern, wurden ebenfalls Änderungen im Bereich der Substratbindetasche vorgenommen, indem Cys158 und Cys281 jeweils durch Serin ersetzt wurden. Diese Änderungen lassen zunächst keine funktionellen wie strukturellen Auswirkungen erwarten. Wie oben bereits erwähnt, wird durch den Wegfall der Aromatizität an der Position 92' das Netzwerk der aromatischen Aminosäuren 326, 330, 92' und 333 aufgebrochen. Ähnliches ergäbe sich bei einer vergleichbaren Substitution an Position 330. Im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit wurde unter Einbeziehung der bereits charakterisierten Variante TGT Y330F ein abgestuftes Substitutionsmuster angestrebt (Y330I, Y330C, Y330D), um auftretende Veränderungen am Enzym den Eigenschaften Aromatizität, Hydrophilie und Polarität zuordnen zu können.

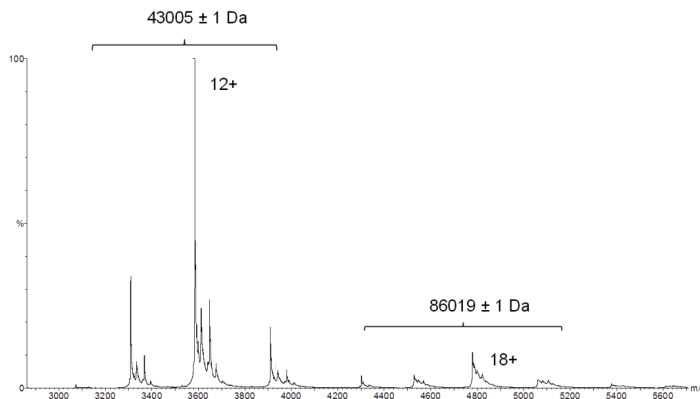
Obwohl die gentechnische Modifikation der Plasmide sowie die Expression aus *E.coli* dem Protokoll aus Kapitel 3.3 folgend umgesetzt wurde, traten unerwartete Probleme auf. Die Produktion von TGT Y330I erfolgte in zu geringem Umfang, um aussagekräftige analytische Daten gewinnen zu können. Es konnte jedoch zweifelsfrei die Identität nach Aufarbeitung durch denaturierende Massenspektrometrie festgestellt werden (vgl. Anhang B). Eine Optimierung im Zuge weiterer Arbeiten ist notwendig. Die Variation

TGT Y330D wurde auf Plasmidebene korrekt umgesetzt, jedoch zeigt das gewonnene Protein nach Produktion und Aufreinigung eine um 11 Da abweichende Masse bei Messung über denaturierende Massenspektrometrie (vgl. Anhang B). Dies könnte einer bis dato nicht aufgetretenen posttranslationalen Modifikation zuzuordnen sein, bei der z.B. die Methylierung des eingefügten Aspartats vorgenommen worden sein könnte (erwartete Massedifferenz 14 Da; zusätzliche Differenz kann über verschiedene Protonierungszustände erklärt werden). Eine Methylierung könnte durch eine vorhandene Methyltransferase in *E.coli* realisiert werden und kann nach bisherigen strukturellen Erkenntnissen bzgl. der Position 330 der TGT nur dann auftreten, wenn diese in monomerer Form oder noch ungefaltet vorliegt. Ein struktureller Nachweis für die Methylierung konnte wegen der ausbleibenden Kristallisation nicht erbracht werden.

Molekularbiologische Charakterisierung

Die drei erfolgreich in ausreichender Menge exprimierten TGT Varianten wurden zunächst mit nativer nano-ESI Massenspektrometrie auf ihren Oligomerisierungszustand hin geprüft. Dabei konnten gute Ergebnisse für die Varianten TGT Y330D und TGT F92C/C158S/C281S beobachtet werden. Für diese zwei Veränderungen wurde der Nachweis des überwiegend monomerisierten Enzyms erbracht, wobei die Masse jeweils der Polypeptidkette mit einem gebundenen Zinkatom entspricht. Auf Grund experimenteller Schwierigkeiten beim Pufferwechsel an TGT Y330C wies das zugehörige Spektrum nur eine verminderte Qualität auf. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist gerade noch genügend, um sicher aussagen zu können, dass auch diese Variante vorwiegend als Monomer mit einem gebundenen Zinkion vorliegt. Alle drei Varianten führen also zur Monomerisierung des Enzyms unter den gegebenen Bedingungen bzgl. Puffer und bei einer Konzentration von 10 μM bezogen auf die monomere TGT. Die Annahme von kooperativen Effekten innerhalb des aromatischen Clusters ist damit phänomenologisch gezeigt, soll durch weitere Untersuchungen jedoch zusätzlich strukturell charakterisiert werden.

Eine Abstufung des Monomerisierungsgrads abhängig von der Art der an Position ausgetauschten Aminosäure waren bislang nicht erkennbar. Dazu sollten im weiteren Verlauf enzymkinetische Untersuchungen herangezogen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass durch Austausch gegen eine ungeladene Seitenkette in TGT Y330F bzw. TGT Y330C, unabhängig von deren sonstigen Eigenschaften, ein deutlich kleinerer Effekt hinsichtlich der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_M) resultierte. Nach dem Austausch



TGT F92C/C158S/C281S

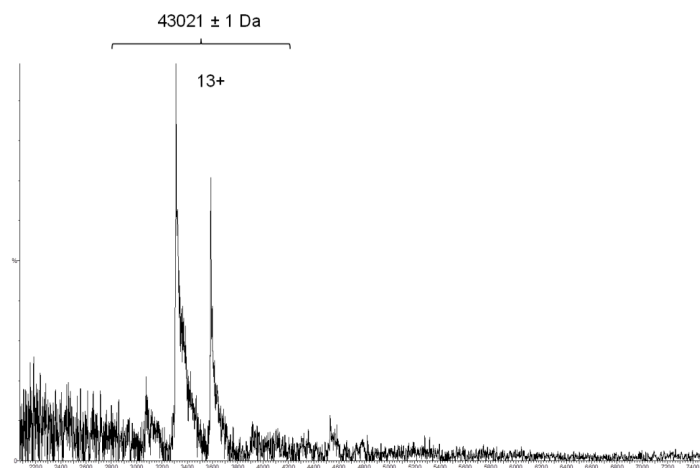
Denat. Masse: 42 935 Da

Theoretische Masse:

Monomer (apo): 42 937.6 Da

Monomer + 1 Zn: 43 003.0 Da

Dimer + 2 Zn: 86 006.0 Da



TGT Y330C

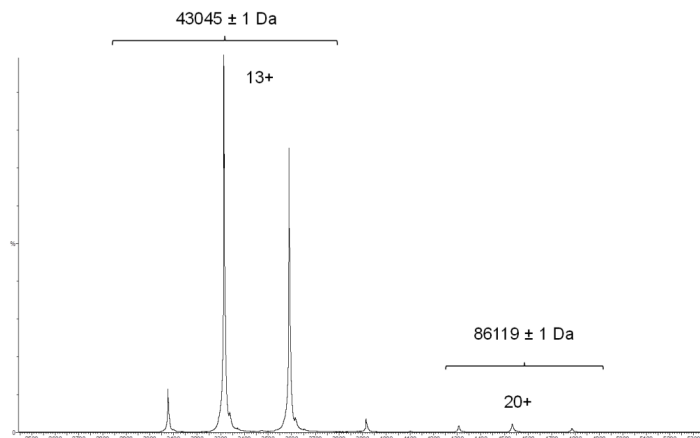
Denat. Masse: 42 951 Da

Theoretische Masse:

Monomer (apo): 42 953.7 Da

Monomer + 1 Zn: 43 019.1 Da

Dimer + 2 Zn: 86 038.2 Da



TGT Y330D

Denat. Masse: 42 977 Da

Theoretische Masse:

Monomer (apo): 42 965.7 Da

Monomer + 1 Zn: 43 031.1 Da

Dimer + 2 Zn: 86 062.2 Da

Abbildung 3.26: Native Massenspektrometrie an TGT F92C/C158S/C281S, TGT Y330C und TGT Y330D (von oben nach unten, 10 mM in Ammoniumacetatpuffer). Aufgetragen ist das Spektrum mit aus externem Standard ermitteltem Masse-zu-Ladungsverhältnis auf der Abszisse. Die Rekonstruktion der Masse ist über dem jeweiligen Multiplett angegeben. Zum größten Teil liegen die Varianten als Monomer mit je einem gebundenen Zinkion vor. Theoretische Proteinmassen wurden mit Protparam^[87] an Hand der Peptidsequenz berechnet.

in TGT Y330D erfolgte kein messbarer Umsatz des Substrats mehr. Ob mit dieser Mutation eine permanente Ladung am *Interface* eingebracht wurde, ist auf Grund einer möglicherweise aufgetretenen Methylierung fraglich (siehe Diskussion oben). Allerdings zeigte der Austausch an Position 330 einen deutlichen Einfluss auf die Substraterkennung bzw. die Bindungsaffinität der tRNA (gekennzeichnet durch K_M), obwohl eine große Distanz zur Substratbindetasche vorliegt. Ob hier kooperative Effekte die Bindung der tRNA durch strukturelle Umorganisation nach der Mutation an Position 330 schwächen, bleibt zunächst offen und kann erst durch einen Vergleich mehrerer Kristallstrukturen der TGT mit Mutationen in Position 330, ggf. sogar erst im Komplex mit gebundener tRNA, geklärt werden. In der vorliegenden Arbeit ist dieser Versuch nicht unternommen worden.

Tabelle 3.3: Relevante enzymkinetische Parameter hinsichtlich TGT F92C/C158S/C281S sowie TGT Y330X. Für TGT Y330D konnte kein Umsatz des Substrats tRNA gemessen werden.

Mutationen	k_{cat} [$10^{-2}s^{-1}$]	K_M [μM]	$\frac{k_{cat}}{K_M}$ [$10^4 Lmol^{-1}s^{-1}$]
Wildtyp	1.2	4.8	0.25
Y330F	0.10 [68]	1.6 [68]	0.063 [68]
Y330C	0.56	7.4	0.076
Y330D	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
F92C/C158S/C281S	0.30	4.5	0.067

Kristallographische Charakterisierung

Zum Ermitteln struktureller Informationen fand die Röntgenstrukturanalyse des kristallisierten Enzyms Anwendung. Die Variante TGT F92C/C158S/C281S kristallisierte unter den bekannten Bedingungen für den TGT Wildtyp (PEG8000 7%, TRIS 10 mM, pH 8.5, DMSO 10%) spontan innerhalb weniger Tage. Unter kryogenen Bedingungen konnte ein Datensatz mit einer Auflösung von 2.04 Å aufgenommen und die Proteinstruktur in der Raumgruppe C2 mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit gelöst werden (pdb-Code: 4DY1). Analog zum Wildtyp und der im vorangegangenen Kapitel besprochenen Variante TGT C158S/C281S/W326E/E339Q ergänzt sich das Monomer in der asymmetrischen Einheit durch die Kristallsymmetrie zum Dimer, obwohl in der nativen nano-ESI Massenspektrometrie die nahezu vollständige Monomerisierung in Lösung nachgewiesen wurde und die biochemische Aktivität (k_{cat}) verglichen zum Wildtyp um den Faktor 4 verringert ist.

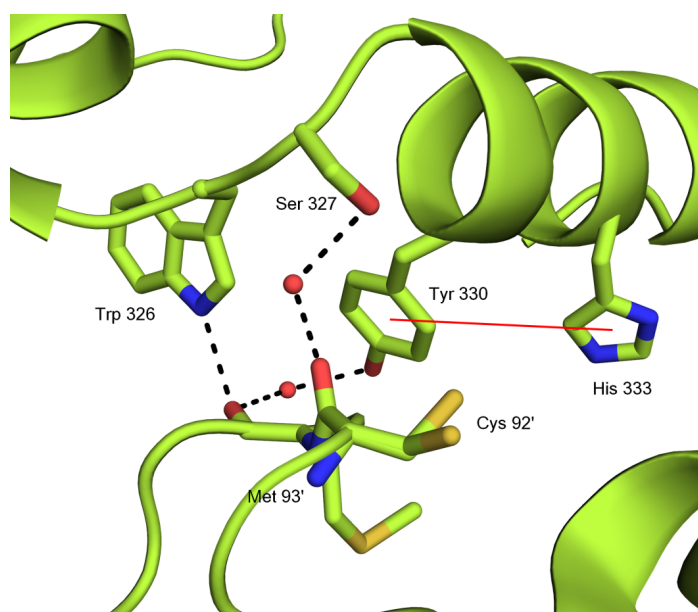


Abbildung 3.27: Ausschnitt aus TGT F92C/C158S/C281S - 4DY1 mit der mutierten Aminosäure Cys92 in zwei möglichen Seitenkettenkonformationen. Der aromatische Cluster bricht auf, Trp326 ist noch an Met93' (3.0 Å) gebunden, von Tyr330 und His333 jedoch isoliert. Deren Abstand (rot markiert) bleibt konstant, das Interaktionsmuster ändert sich jedoch (z.B. Tyr330 - H₂O - Met93' 2.6 Å und 2.8 Å). Neu hinzu kommt eine Wasserbrücke zwischen Ser327 und Cys92' (Abstände 3.0 Å und 2.8 Å).

Die Struktur zeigt an der Stelle der vorgenommenen Mutation keine Dichte für einen Phenylring, stattdessen liegt das eingebrachte Cystein in zwei Konformationen vor. In keiner der beiden Positionen besteht die Möglichkeit einer Interaktion zu Seitenketten anderer Aminosäuren oder zu kristallographisch erfassten Wassermolekülen. Das für die Stabilisierung wichtige aromatische *Stacking* zu Tyr330 und His333 ist nicht mehr möglich. Die Seitenkettenorientierung von Trp326, Tyr330 und His333 sowie der in Abbildung 3.27 rot markierte Abstand von 6.2 Å bleiben gegenüber dem Wildtyp unverändert. Auch die Positionen der Wassermoleküle mit den verbrückten Wasserstoffbrückenbindungen Met93'-H₂O-Tyr330 sowie Cys92'-H₂O-Ser327 bestehen weiterhin. Der direkte Kontakt zwischen dem Carbonylsauerstoff der Hauptkette an Met93' und dem sekundären Amin an der Seitenkette des Trp326 bildet sich in der Kristallpackung ebenfalls aus (3.0 Å). Der im Fokus stehende Cluster aromatischer Aminosäuren wurde durch die Mutation von Phe zu Cys zerstört, ohne dass es zu Kompensationen durch die anderen drei Mitglieder dieser Gruppierung aromatischer Aminosäuren kommt. Den Beobachtungen an TGT C158S/C281S/W326E/E339Q folgend, wurde die Loop-

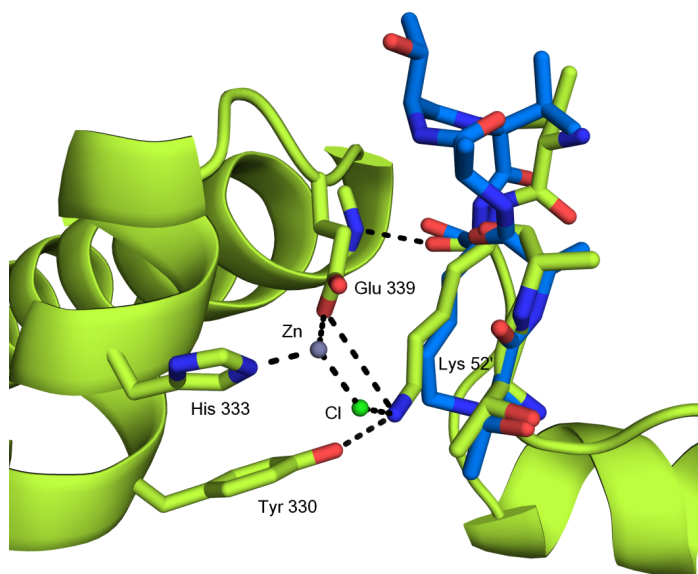


Abbildung 3.28: Darstellung der Interaktionen des Loop 47' bis 52' in TGT F92C/C158S/C281S - 4DY1 (gelb) im Vergleich zu TGT C158S/C281S/W326E/E339Q - 3UVI (blau). Der Verlauf von Thr47', Ala48', Val51' und Lys52' ist nahezu identisch, in 4DY1 konnten Ala49' und Thr50' nicht in die Dichtekarte modelliert werden. Die Wechselwirkung Lys52' - Leu341 2.8 Å wird identisch ausgebildet, eine Drehung der Seitenkette von Lys52' bedingt durch die im *Interface* platzierten Chlorid- und Zinkionen hat zusätzliche Interaktionen zur Folge (Lys52' - Tyr330 3.1 Å, Lys52' - Glu339 3.8 Å).

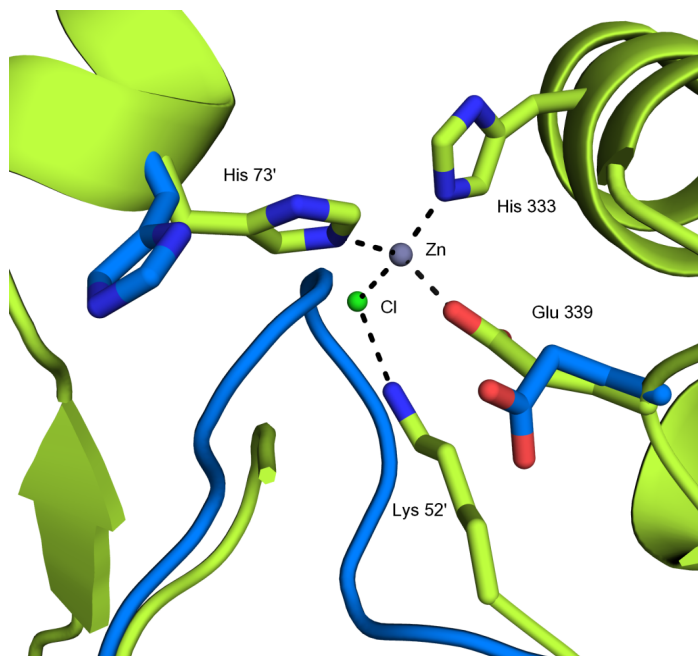
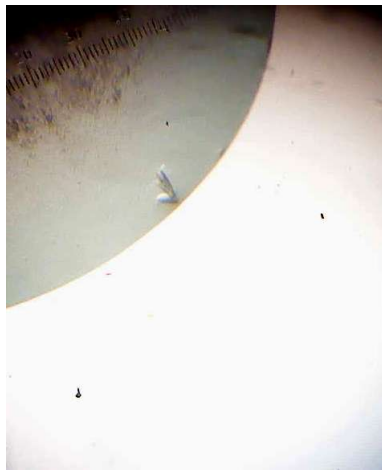


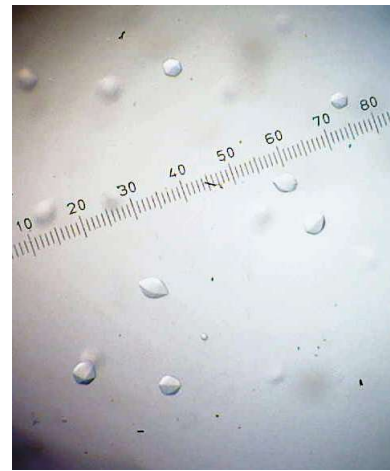
Abbildung 3.29: Detailansicht einer in TGT F92C/C158S/C281S - 4DY1 (gelb) neuartigen Zinkbindestelle, die direkt im *Interface*-Bereich zwischen den Homodimerpartner liegt. Ein Zinkion (grau) ist tetraedrisch von His333, Glu339, His73' sowie einem Chloridion (grün) umgeben (Abstände 2.1 Å ... 2.2 Å), dies ist wiederum an Lys52' gebunden (2.8 Å). Vergleicht man mit TGT 158S 281S 326E 339Q - 3UVI (blau), so sind His73' und Glu339 zur Ausbildung dieser Koordinationsstelle gedreht angeordnet.

Region von Thr46 bis Lys52 in TGT F92C/C158S/C281S ebenfalls eingehend inspiziert und mit den bisherigen Ergebnissen verglichen. Dabei deuten die kongruenten Verläufe der in der Dichtekarte sichtbaren Aminosäuren in diesem Bereich eine äquivalente Orientierung im Vergleich zur Struktur von TGT W326E/E339Q an, wenn auch, bedingt durch die etwas niedrigere Auflösung, die Aminosäuren Ala49 und Thr50 nicht verfeinert werden konnten. Die Ausrichtung der Kopfgruppe des Lys52 hin zur negativen Ladung an Glu339' (Abstand 3.8 Å, Glu339' gegenüber Wildtyp um 70° gedreht) sowie zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung hin zu Tyr330' (Abstand 3.1 Å) stabilisiert die eingenommene Konformation genauso wie die Wasserstoffbrücke zwischen den Hauptkettenatomen an Lys52 und Leu341' (Abstand 2.8 Å, in 3UVI analog). Somit zeigt auch die Variante TGT F92C/C158S/C281S die erstmals in 3UVI neu entdeckte Kavität im *Interface*-Bereich des Dimerkomplexes. Einen wesentlichen Unterschied hingegen stellt die Ausbildung einer neuen Zink(II)-Bindestelle im Bereich des *Interface* der Struktur 4DY1 dar: Bei einem Abstand von je ca. 2.1 Å tetraedrisch von His73', His333, Glu339 sowie einem Chloridion umgeben verbrückt dieses Kation beide Dimerpartner. Damit wird der durch die geänderte Loop-Konformation freigegebene Raum ausgefüllt, wobei, wie in Abbildung 3.29 gezeigt, hierzu die Rotation von His73' sowie Glu339 notwendig ist. Das beteiligte Chloridion ist weiterhin an Lys52' über eine Salzbrücke im Abstand von 2.8 Å gebunden. Beide Ionen sind nicht in der nativen Massenspektrometrie detektierbar (theoretischer Wert für das Dimer einschließlich des genannten Zink- und Chloridions 86 106.8 Da, ohne diese Ionen 86 012.0 Da, gefunden für Dimer 86 019 Da). Ein Vergleich der B-Faktoren des hier diskutierten neuen Zinkions (28.53 Å^2) mit dem des Zinkions aus der nativen Zinkbindestelle (14.19 Å^2) zeigt, dass das neu gefundene Zinkion eine erhöhte Mobilität aufweist oder diese ggf. nicht voll populiert ist. Da die Lage zudem oberflächennah ist (lediglich His73' schirmt diese Stelle gegen das Solvens ab), werden die Ionen (Zink- und Chloridion) höchstwahrscheinlich bei der Ionisation des Enzyms im massenspektrometrischen Experiment aus dem Komplex entfernt. Weiter enthält die Kristallisationsbedingung kein Zink(II)-Salz, sodass als Zinkquelle Verunreinigungen in den Reinigungspuffern und/oder Kristallisationsansätzen vermutet werden, da Zink(II)-Ionen praktisch ubiquitär in allen biologischen Materialien einschließlich dem über Ionenaustauscher gereinigtem Wasser in Spuren enthalten sind.

Bei der Kristallisation von TGT Y330C und TGT Y330D mussten nach erfolglosen Versuchen unter den bisher verwendeten Bedingungen neue Konditionen an Hand



(a) Rhomboeder in PEG 8000
7%, DMSO 10%, TRIS 0.1 M
pH 8.5



(b) Hexagonale Bipyramide in
PEG 3350 20%, MgAc 0.2 M

Abbildung 3.30: Vergleich der bei Kristallisation von TGT Y330C erhaltenen Kristallmorphologien

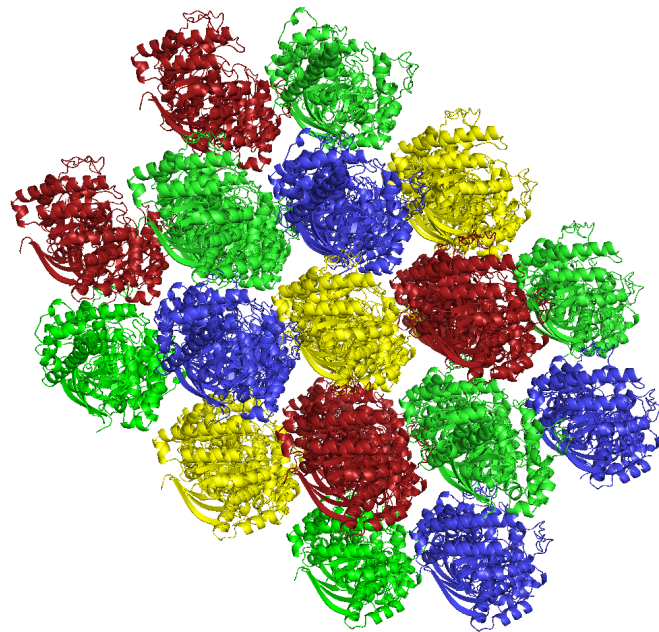


Abbildung 3.31: Packung von TGT Homodimerkomplexen im Kristallverband der Raumgruppe C2 am Beispiel des TGT Wildtyp - 1PUD. Einzelne Stränge mit in Blickrichtung hintereinander angeordneten Enzymkomplexen sind zum Nachbarstrang in der dichten Packung um je $1/4$ versetzt. Die unterschiedlichen Höhen sind durch die vier Farben rot, gelb, grün und blau gekennzeichnet.

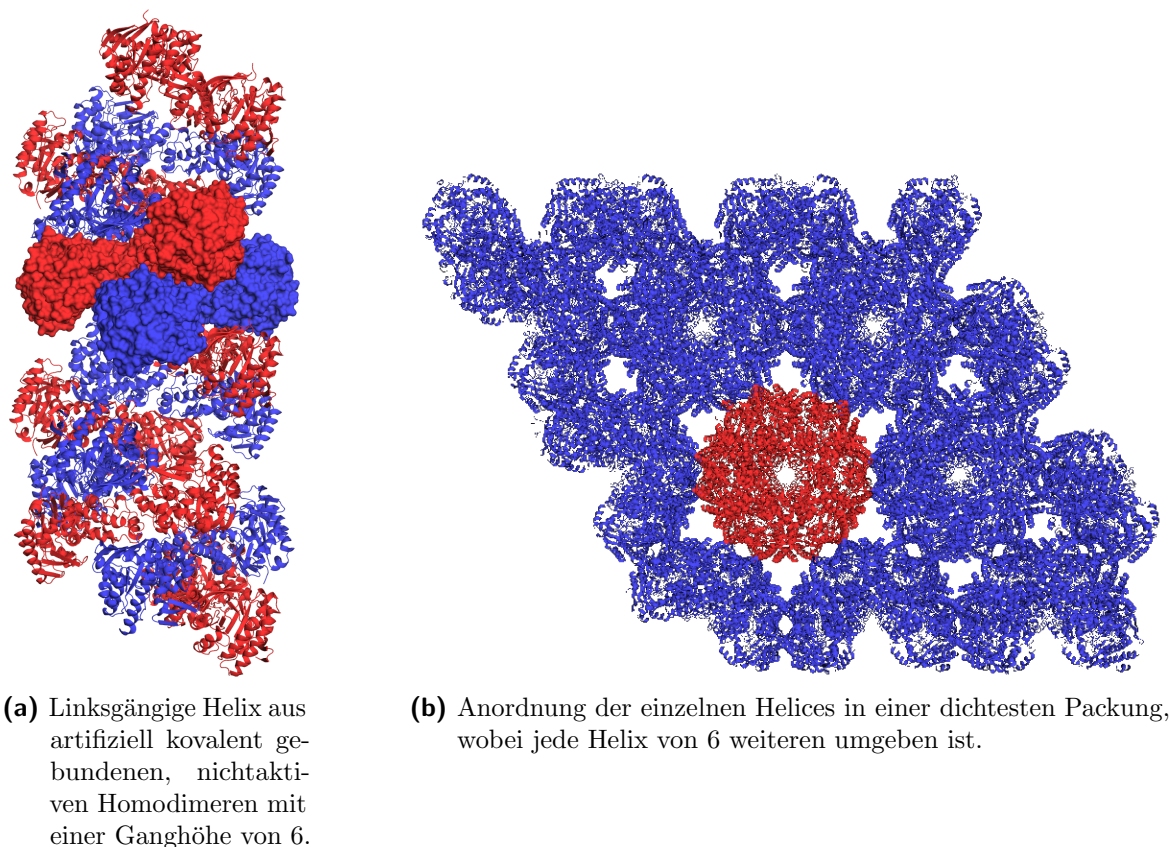


Abbildung 3.32: Illustration der Packung von TGT Y330C in der Raumgruppe $P6_522$ - 4JBR. Bedingt durch die Änderung der Gestalt des Homodimers kommt es zur Neuordnung der Moleküle im Kristall.

eines intensiven *Screenings* von ca. 800 Ansätzen gefunden werden. Dabei konnte für TGT Y330D keine Kristallbildung innerhalb von vier Monaten beobachtet werden. TGT Y330C hingegen kristallisierte bereitwillig in einer Vielzahl von Bedingungen, deren gemeinsames Merkmal der Zusatz von PEG3350 in einer Konzentration von ca. 20% als Präzipitans war. Dabei traten zwei verschiedene Kristallformen auf, die sich optisch in ihrer Morphologie deutlich unterschieden. Zum einen konnten die bekannten rhomboedrischen Kristalle analog des TGT Wildtyps und der anderen in dieser Arbeit kristallisierten TGT Varianten beobachtet werden (auch reproduzierbar unter den Bedingungen PEG 8000 7%, DMSO 10%, TRIS 0.1 M pH 8.5, Abbildung 3.30a). Darüber hinaus fanden sich häufig hexagonale Bipyramiden als erstmals für eine TGT Variante beobachtete Kristallmorphologie (Abbildung 3.30b hier in PEG 3350 20%, MgAc 0.2 M). Die Kristalle wurden unter kryogenen Bedingungen vermessen und die

Strukturen mit einer Auflösung von 1.90 Å (4HTB) bzw. 2.92 Å (4JBR) gelöst. Die Strukturen der rhomboedrischen Kristalle der TGT Y330C in Raumgruppe C2 (4HTB) und aller bisher in dieser Arbeit untersuchten TGT Varianten sowie alle in der Proteindatenbank hinterlegten TGT Strukturen (mit Ausnahme derer, die zusätzlich gebundene tRNA enthalten) zeigen eine Anordnung der Moleküle mit axialer Ausrichtung, die der längsten Achse des funktionellen Dimers folgt. Die einzelnen Stränge kommen nebeneinander so zu liegen, dass in der Horizontalen jeweils eine Verschiebung um 1/4 der Dimerlänge erfolgt (vgl. Abbildung 3.31 grün-blau-gelb-rot-grün-blau-...), 45° versetzt wird jeweils eine deckungsgleiche Anordnung realisiert. Diese Anordnung wird beim Wechsel der Raumgruppe bei TGT Y330C in P6₅22 (4JBR) vollständig aufgegeben. Hier sind die nichtfunktionalen, kovalent über eine Disulfidbrücke gebundenen TGT Dimere (Beschreibung s.u.) um 60° gedreht zueinander in einer linksgängigen Helix mit einer Ganghöhe von sechs Dimeren angeordnet (vgl. Abbildung 3.32a blau-rot-blau-rot-...). Im Kristallverband bilden die Helices untereinander eine dichteste Packung aus (Abbildung 3.32b). Durch die erzwungene Umordnung finden im Bereich der kristallographischen Kontakte weitreichende Änderungen statt. Durch PISA wurden alle gerichteten Interaktionen für TGT Y330C sowohl in C2 als auch in P6₅22 analysiert und in Tabelle 3.4 verglichen. Während bei der C₂-symmetrischen Variante das signifikant größte *Interface* auch die meisten Kontakte hat und mit dem biologisch relevanten Dimer-*Interface* zusammenfällt, finden sich in der Raumgruppe P6₅22 vier annähernd gleich große Kontaktflächen, von denen keine mit Bereichen des Wildtyp-*Interface* übereinstimmt. Die Anzahl der Kontakte ist zwar an *Interface* 2 am größten, allerdings ist die sich neu ausbildende kovalente Bindung an *Interface* 1 bei der Bewertung der Stabilisierung im Zuge der Dimerisierung entscheidend. Betrachtet man zunächst die Auswirkungen bei der Mutante TGT Y330C im, zum funktionalen Dimer des Wildtyps analogen, kristallographischen Dimer in der Kristallstruktur der Raumgruppe C2 (4HTB), so werden bereits einige Merkmale deutlich, die zu einer verminderten Dimerstabilisierung führen. Der aromatische Cluster wird durch den Austausch zu Cystein aufgebrochen, das *Stacking* zu Trp326 entfällt (Abbildung 3.33). Dadurch wird dessen Seitenkette die Möglichkeit zur Rotation um 180° gegeben, die Wasserstoffbrücke zu Met93' wird aufgegeben und an Stelle derer zwei Wassermoleküle gebunden (2.9 Å & 3.4 Å), die auf Glu57' verbrücken (zur vermehrten Einlagerung von Wasser im Interfacebereich vgl. auch Abbildungen 3.8 und 3.20). Durch den Flip besteht zudem die Möglichkeit einer geänderten Konformation für

Tabelle 3.4: Vergleich der *Interface*-Aminosäuren für TGT Y330C in den Raumgruppen P6₅22 - 4JBR und C2 - 4HTB. Die Daten wurden mittels PISA und Pymol zusammengestellt und beinhalten auch reine Kristallkontakte. Es wurden lediglich gerichtete Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken und die Disulfidbrücke) ohne die Einbeziehung von Wassermolekülen berücksichtigt.

TGT Y330C P6 ₅ 22		TGT Y330C C2	
<i>Interface 1 - 537 Å²</i>		<i>Interface 1 - 1540 Å²</i>	
330 – 330'	2.0 (DSB)	325 – 57'	2.5
325 – 333'	3.5 (Pymol)	330 – 92'	3.4
333 – 325'	3.5 (Pymol)	325 – 94'	3.0
		82 – 309'	3.3
		77 – 336'	3.5
		77 – 337'	3.6
		47 – 339'	3.1
		52 – 339'	2.6
		55 – 348'	2.7
		57 – 325'	3.0
		92 – 330'	3.4
		94 – 325'	3.0
		309 – 82'	3.3
		336 – 77'	3.5
		337 – 77'	3.6
		339 – 47'	3.1
		339 – 52'	2.6
		348 – 55'	2.7
<i>Interface 2 - 412 Å²</i>		<i>Interface 2 - 269 Å²</i>	
23 – 127'	3.8	13 – 166'	3.6
316 – 336'	3.0	13 – 170'	3.6
323 – 336'	2.4	254 – 119'	2.7
324 – 336'	2.8	193 – 166'	3.2
366 – 77'	3.5	254 – 174'	3.7
368 – 127'	3.5	15 – 177'	3.5
<i>Interface 3 - 410 Å²</i>		<i>Interface 3 - 231 Å²</i>	
120 – 136'	3.1	367 – 301'	3.5
120 – 139'	3.1	367 – 303'	2.9
120 – 139'	3.4	367 – 303'	3.1
136 – 120'	3.1	368 – 303'	3.5
139 – 120'	3.1	366 – 305'	3.1
139 – 120'	3.4	366 – 305'	3.3
		366 – 336'	2.9
<i>Interface 4 - 354 Å²</i>		<i>Interface 4 - 107 Å²</i>	
57 – 60'	3.7		
60 – 57'	3.7		
324 – 325'	2.8		
325 – 324'	2.8		

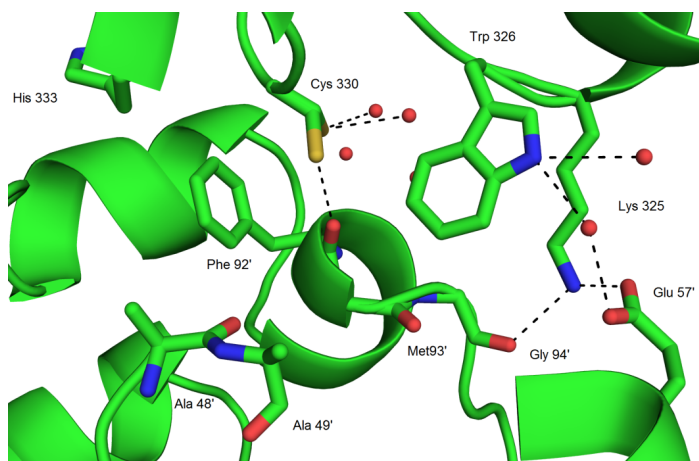


Abbildung 3.33: Detailansicht des aufgelösten aromatischen Clusters in TGT Y330C der Raumgruppe C2 (4HTB). In Folge des Austausch Tyr gegen Cys kommt es zum Flip von Trp326 und zur Drehung von His333. Zusätzlich werden mehrere Wassermoleküle in die Struktur an Cys330 (3.1 Å & 3.6 Å) sowie an Trp326 (2.9 Å & 3.4 Å) eingelagert. Eine Kompensation der gebrochenen Bindungen erfolgt über Lys325, das an Glu57' (2.5 Å) sowie Gly94' (3.0 Å) bindet, sowie über die Wasserstoffbrückenbindung einer der alternativen Konformationen des Cystein an Phe92' (3.2 Å) (zur Situation im Wildtyp vgl. Abbildung 3.25).

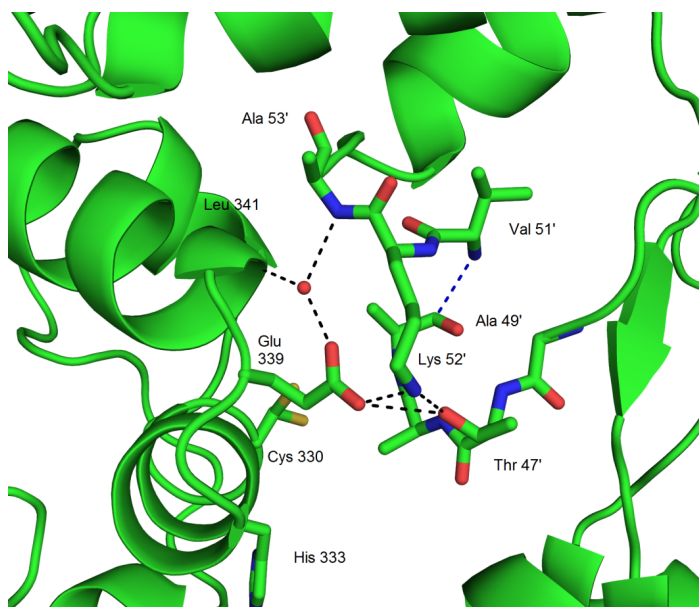


Abbildung 3.34: Detailansicht des Loopbereichs 46 bis 52 in TGT Y330C der Raumgruppe C2. Der Verlauf folgt im Wesentlichen dem des Wildtyps (vgl. Abbildung 3.23). Thr50' konnte nicht in die Elektronendichte eingepasst werden und ist mit einem blauen Strich symbolisiert. Durch die Drehung von His333 sowie die Mutation Tyr330 zu Cys werden die Wasserstoffbrückenbindung zu Ala48' und Ala49' nicht mehr ausgebildet. Lys52' und Thr47' binden direkt an Glu339 (2.6 Å & 3.1 Å), ein Wassermolekül verbrückt Interaktionen zwischen Ala53', Glu339 und Leu341 (2.6 Å ... 3.6 Å).

Lys325, das nun eine Salzbrücke zu Glu57' (2.5 Å) sowie eine Wasserstoffbrückenbindung zu Gly94' (3.0 Å) ausbildet. Hierdurch wird ein Teil der gegenüber dem Wildtyp verlorenen Stabilisierung der Kristallpackung kompensiert. Auf der anderen Seite verbleibt Phe92' trotz der fehlenden aromatischen Wechselwirkungen in seiner Position. Die Interaktion von Phe92' zu His333 ist jedoch nicht mehr gegeben: Die Seitenkette am Histidin ist um ca. 120° gedreht und bildet keine gerichteten Wechselwirkungen zum Dimerpartner mehr aus. Die im Wildtyp ausgebildete Wasserstoffbrücke von Tyr330 zu Ala49' ist nicht mehr möglich, daher kommt es beim Dimerpartner zu einer leichten Verschiebung (ca. 1.2 Å) des sich dort befindlichen Loops 46' bis 52' (Thr50' konnte jedoch nicht in die Elektronendichte eingepasst werden). Dieser ist nicht wie bei TGT C158S/C281S/W326E/E339Q und TGT F92C/C158S/C281S in einer vom Wildtyp komplett abweichenden Konformation angeordnet, sondern entspricht in seiner Geometrie bis auf kleinere Fluktuationen dem bekannten Verlauf des Wildtypenzym (Abbildung 3.34). Einzige Ausnahme hiervon bildet die Orientierung der Seitenkette von Lys52', die sowohl zu Glu339 des Dimerpartners eine Salzbrücke (2.6 Å) als auch intern eine Wasserstoffbrücke zu Thr47' (2.3 Å) ausbildet. Der Austausch Tyr gegen Cys ermöglicht durch den geringeren sterischen Anspruch der Seitenkette, zusätzliche Wassermoleküle in das Interface mit aufzunehmen, die an Cys330, welches in zwei Konformationen vorliegt, binden (3.1 Å & 3.6 Å) und eine Verbrückung zum Carbonylsauerstoffatom der Hauptkette an Phe92' (3.2 Å) ermöglichen. Insgesamt kommt es damit im Bereich des Interface zur Auflösung des aromatischen Clusters sowie der zusätzlichen Einlagerung von Wassermolekülen. Die Stabilisierung des kristallographischen Dimers durch eine teilweise Kompensation mittels Wasserstoffbrückenbindungen in Folge von Seitenkettenrotationen sowie die sonstigen Kontakte im Kristallverbund verhinderten an dieser Stelle wiederum die Aufklärung der Struktur der monomeren TGT.

Weitgehende Unterschiede zum Wildtyp zeigten sich hingegen in der zweiten Strukturvariante von TGT Y330C. Eine Erklärung für die völlig neue Anordnung in der abweichenden Packung mit geänderter Raumgruppensymmetrie erfordert die eingehende Analyse dieses Dimers in der Raumgruppe P6₅22. Es wurde, vermutlich durch die oxidierenden Bedingungen an Luftsauerstoff, während der Kristallisation eine Disulfidbrücke zwischen Cys330 und Cys330' ausgebildet, die in Folge ein neues Protein-Protein-*Interface* erzwingt. Die Fläche ist mit 571 Å² nur ein Drittel so groß wie beim funktionalen, nichtkovalent verknüpften Dimer des TGT Wildtypenzym. Die Mo-

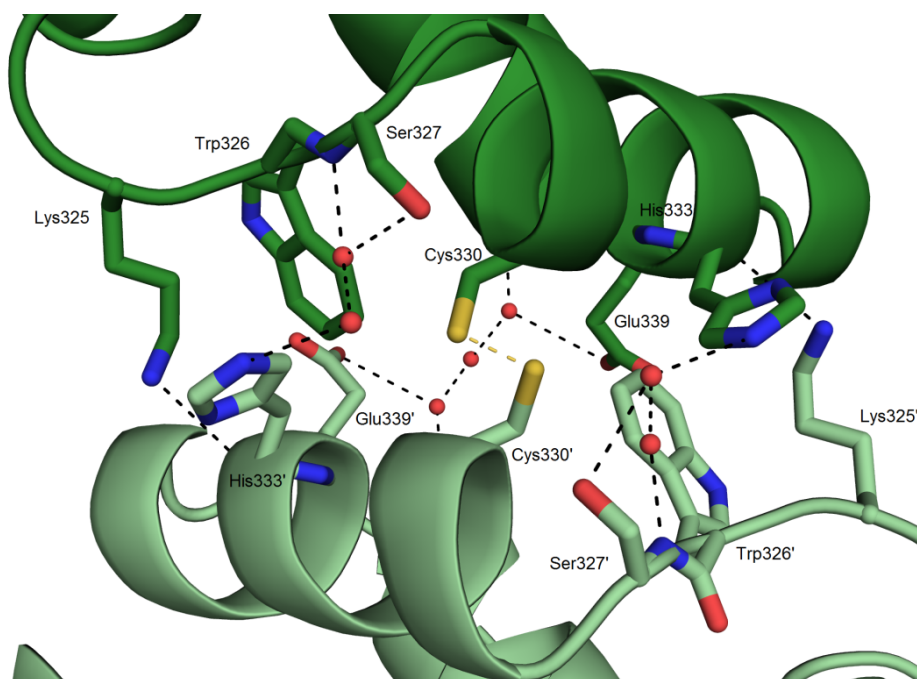


Abbildung 3.35: Detaildarstellung zum Homodimer-*Interface* an TGT Y330C in der Raumgruppe P₆₅22 - 4JBR. Die beiden Monomere (hellgrün und dunkelgrün) sind über die kovalente Bindung Cys330-Cys330' (2.0 Å) sowie die Wasserbrückennetzwerke His333 - Lys325' (3.5 Å), His333 - H₂O (- H₂O) - Ser327' (2.5 Å ... 3.0 Å) und umgekehrt bzw. Glu339 - H₂O - H₂O - H₂O - Leu341' (2.4 Å ... 3.4 Å) und umgekehrt verknüpft.

nomere lassen sich über eine zweizählige Drehachse senkrecht zur neu ausgebildeten Disulfidbrücke aufeinander abbilden, das Dimer ergibt sich bei Erweiterung der asymmetrischen Einheit (die nur ein Monomer umfasst) um den Symmetriepartner. Das Zentrum der neu gebildeten Disulfidbrücke liegt damit auf einem Symmetriezentrum, der zweizähligen Achse. Diese Symmetrie erstreckt sich auch auf die Kontakte am neuen *Interface*. In Abbildung 3.35 sind die wenigen direkten und indirekten Verbrückungen gezeigt. Die Disulfidbrücke hat einen artifiziellen Charakter, da die beteiligten Cysteine lediglich auf Grund der eingebrachten Mutation vorhanden sind – somit eine solche Anordnung für den Wildtyp nicht zu beobachten wäre. In der hier gezeigten Struktur erzwingen sie die neue Packung und übernehmen einen wichtigen Teil der Dimerstabilisierung zusammen mit den beiden doppelt auftretenden, schwachen Wasserstoffbrücken zwischen His333 und Lys325' und umgekehrt. Zusätzlich verbrücken in zweifacher Weise je zwei Wassermoleküle die Aminosäuren His333 und Ser327' (Abstände 2.4 Å bis 3.0 Å) bzw. Ser327 mit His333'. Weiterhin befindet sich ein symmetrisch ange-

ordneter Wassercluster am *Interface*, der die Seitenketten Glu339 und Glu339' mit der Hauptkette an Leu341 und Leu341' verbindet. Alle weiteren am ursprünglichen Wildtyp-*Interface* beteiligten Aminosäuren gehen in der neuen Packung keine Bindung ein (so z.B. Seitenkette Trp326) oder befinden sich nicht mehr in der Nähe des neu ausgebildeten *Interface* (z.B. Lys55).

Der aromatische Cluster ist vollständig aufgebrochen: Tyr330 wurde durch Cys ersetzt, sodass Trp326 ebenfalls über keinen aromatischen *Stacking*-Partner mehr verfügt (die Wasserstoffbrückenbindung am Wildtyp-*Interface* zu Met93' wird ebenfalls bei TGT Y330C nicht mehr ausgebildet). Durch die Neugestaltung des Dimerkontakts ist Phe92' räumlich weit weg verschoben und His333 trägt mit den oben angesprochenen Wasserstoffbrückenbindungen als letzte verbliebene Seitenkette zur Dimerstabilisierung bei, allerdings nicht auf Grund seines aromatischen Charakters. Der Abstand Trp326 zu His333' ist mit ca. 6.0 Å für einen signifikanten Bindungsanteil zu weit.

Die kovalente Stabilisierung am neu ausgebildeten *Interface* führt zu einer völlig abweichenden Orientierung der Monomere innerhalb des ausgebildeten TGT Dimers. Überlagert man, wie in Abbildung 3.36 angedeutet, eines der Monomere (in dunkelgrün) mit der Wildtypstruktur (Oberflächendarstellung), so stellt man fest, dass das andere Monomer (hellgrün) gedreht und außerhalb des ursprünglich in Anspruch genommenen Raumes zu liegen kommt. Die Überlagerung zeigt auch, dass der *Interface*-Bereich des Wildtypdimers in der hexagonalen Struktur der TGT Y330C weitgehend frei liegt und Raum zur Verfügung stehen würde, um Umfaltungen oder Auflösung von Sekundärstrukturelementen zu begünstigen. Allerdings wird dies nicht beobachtet. Fast das gesamte Protein ist auch in der geänderten Umgebung strukturell in einer geordneten Konformation definiert. Lediglich der bereits oben diskutierte Loop-Bereich 46 bis 52 weicht in seinem Verlauf vom Wildtyp (blau dargestellt) ab. Es wird dabei eine bisher noch nicht beobachtete Konformation bevorzugt, die in Richtung des Solvens zeigt. Eine von sterischen Wechselwirkungen gestörte Zusammenlagerung beider Monomere nach der C2-Symmetrie in der Kristallpackung, die für den Wildtyp gefunden wird, wäre bei diesem Loop-Verlauf nicht möglich. Eine weitere Stabilisierung durch benachbarte Aminosäuren oder Beeinflussung durch die eingefügten Mutationen besteht nicht. Somit darf spekuliert werden, dass diese hier erstmalig gefundene Konformation dieser Schleife nur für monomerisierte TGT und ggf. auch in Lösung auftritt.

Für die Variante TGT C158S/C281S/W326E/E339Q wurde bedingt durch die neu gefundene Loop-Konformation eine Tasche geöffnet, deren Einflussbereich sich auf Teile

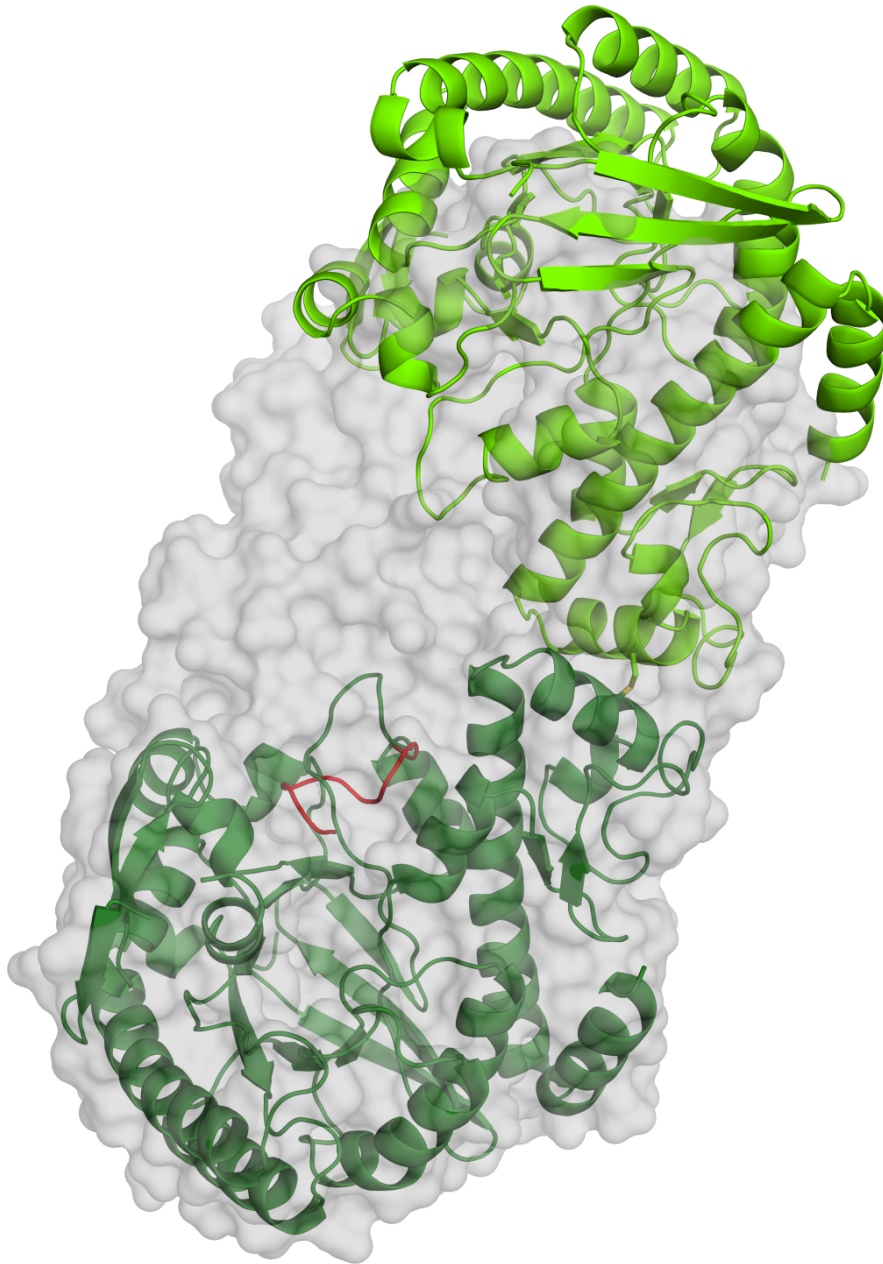


Abbildung 3.36: Vergleich der Gestalt der Homodimere in den Raumgruppen P6₅22 - 4JBR und C2 - 1PUD. Der Wildtyp ist als halbtransparente Oberfläche (grau), TGT Y330C als Cartoon (hell- und dunkelgrün) dargestellt. Das untere der beiden Monomere wurde überlagert. Deutlich erkennbar ist die Lageveränderung des Komplexpartners. Das Molekül ist um 180° gedreht und über die Disulfidbrücke wird ein artifizielles *Interface* ausgebildet. Eine weitere Abweichung ergibt sich im Loopbereich 46 bis 52, die in der P6₅22-Struktur einen völlig anderen Verlauf einnimmt. Die Konformation in Wildtyp - 1PUD in der Raumgruppe C2 ist in rot dargestellt.

des Dimer-*Interface* erstreckt. Eine Modellierung zeigt, dass durch die Platzierung eines Liganden in dieser neu ausgebildeten Tasche wesentliche Wechselwirkungen zum anderen Monomer bei der Ausbildung des biologisch relevanten und großflächigen *Interface* unterdrückt werden könnten (vgl. Abbildung 3.24). Gleiches gilt auch für TGT F92C/C158S/C281S, da hier der Verlauf des Loops eine analoge Geometrie annimmt. Anders ist hingegen die Anordnung bei TGT Y330C in der Raumgruppe P6₅22: Durch den Verlust des Kristallkontakts zum Dimerpartner nimmt der Loop eine weitere Konformation ein, die die räumliche Gestalt im Umfeld der Kavität verändert. In Abbildung 3.37 ist ein Vergleich beider in dieser Arbeit neu strukturell charakterisierten Ausprägungen der Proteinregion gezeigt. Auf der linken Seite der Tasche überlagern beide Strukturen gut, lediglich Phe92 ist um etwa die Hälfte des Phenylrings verschoben. Während bei TGT C158S/C281S/W326E/E339Q - 3UVI die Aminosäuren 46 bis 52 die rechte Flanke der Tasche bilden, findet man diese bei TGT Y330C in der Raumgruppe C2 - 4JBR in Richtung des Solvens zeigend, wodurch sich der obere Teil der Tasche schließt. Gleichzeitig öffnet sich an der durch die Umorientierung der Schleife freigegebenen Stelle eine Subtasche, die fast ausschließlich von hydrophoben Aminosäuren umgeben ist. Darin eingebettet konnte bei der Strukturlösung ein Molekül DMSO sowie ein Netzwerk von 4 Wassermolekülen verfeinert werden. Dimethylsulfoxid wurde als geringer Bestandteil des Cryopuffers eingesetzt. Es ist in der Lage tief vergraben in der hydrophoben Tasche und bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu den Amidfunktionalitäten an Gly46 (3.5 Da) und Ala48 (3.2 Da) bzw. zum Carbonyl der Hauptketten an Met93 (3.2 Da) aus. Die Wassermoleküle besetzen den restlichen Raum und sind u.ä. ebenfalls über gerichtete Wechselwirkungen am Protein fixiert (Bindungspartner Thr47, Lys52, Met344). Ganz analog zur Tasche in den TGT Varianten C158S/C281S/W326E/E339Q und F92C/C158S/C281S wird diese Kavität in TGT Y330C in Raumgruppe C2 durch Liganden in der Kristallstruktur ausgefüllt, die im weiteren Verlauf durch potentielle Wirkstoffvorläufer verdrängt werden könnten. Der Taschenbereich ist im biologisch relevanten Dimer Teil des hydrophoben Kerns des Enzyms. Nach erfolgter Monomerisierung könnte jedoch eine Adressierung dieses Bereichs mit apolaren Bausteinen eines potentiellen Liganden vorgenommen und eine strukturelle Blockierung erreicht werden. Um hier detaillierte Aussagen treffen zu können, wäre eine Proteinstrukturbestimmung bei höherer Auflösung erforderlich, um die eingenommenen Seitenkettenkonformationen und eventuell weitere gebundene Wassermoleküle genauer charakterisieren zu können.

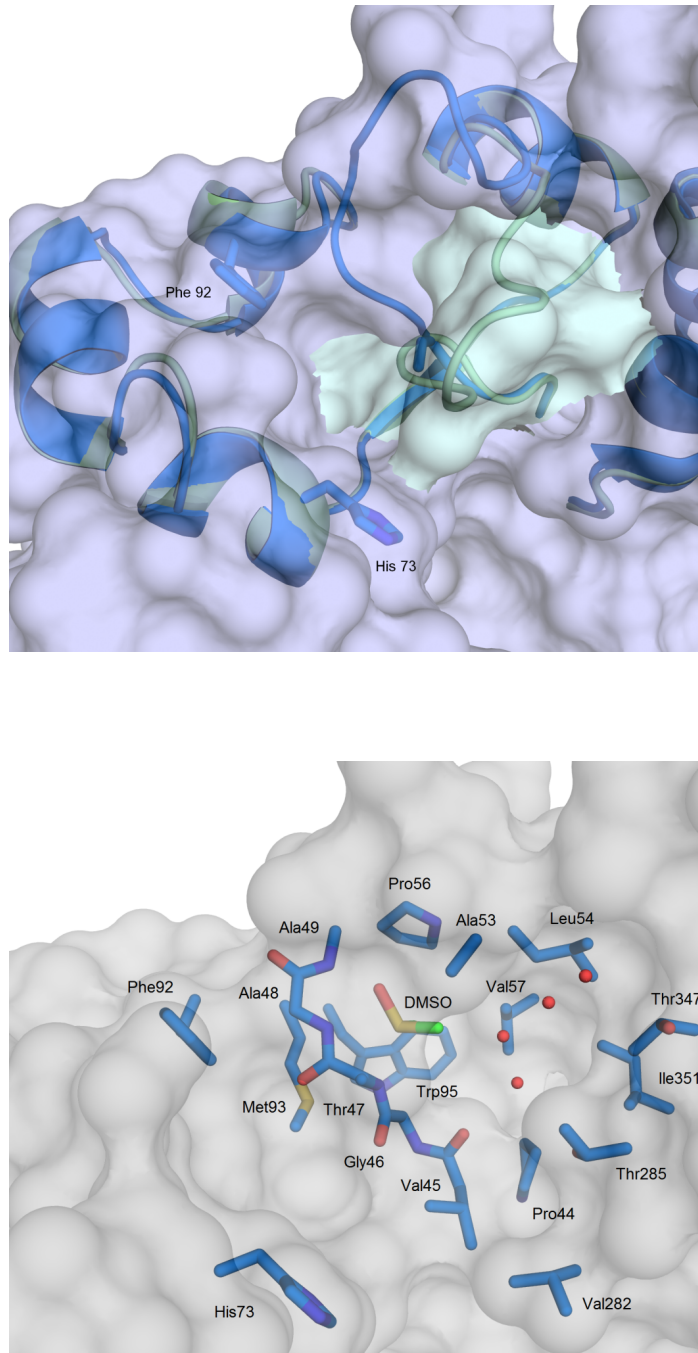


Abbildung 3.37: Vergleich der Kavitäten im Bereich des *Interface* an TGT C158S/C281S/W326E/E339Q - 3UVI (hellgrün) und TGT Y330C - 4JBR (blau). Deutliche Veränderungen ergeben sich an der rechten Seite, deren Gestalt durch den Loop 46 bis 52 bestimmt wird. Fungiert dieser in 3UVI als ein Deckel (oberes Bild, heller Bereich), und verschließt eine hydrophobe Subtasche, so ist er in 4JBR zum Solvens hin in einer geöffneten Konformation. Die Tasche ist im Kristall durch ein Molekül Dimethylsulfoxid (DMSO) und ein Netzwerk von vier Wassermolekülen (unteres Bild) besetzt. In Lösung wird dieser Bereich des Proteins wahrscheinlich frei zugänglich.

3.6 Diskussion II: Konformative Freiheiten des TGT Monomers in Lösung

Das Ziel der vorangegangenen Untersuchungen ist, zu erfahren, wie ein Ligandmolekül beschaffen sein müsste, um das biologisch relevante *Interface* an TGT zu blockieren. Im Hinblick auf den Entwurf eines Liganden im Rahmen des strukturbasierten Wirkstoffdesign stellt sich damit die Frage nach den strukturellen Eigenschaften des TGT Monomers besonders für die Bereiche, die im katalytisch aktiven Dimer den Kontakt zwischen den beiden Monomeren herstellen. Während mit den Varianten TGT C158S/C281S/W326E/E339Q und TGT F92C/C158S/C281S lediglich erste Hinweise auf eine vorhandene Flexibilität im Bereich der Aminosäuren 46 bis 52 gewonnen werden konnten, zeigte TGT Y330C in der erstmals aufgetretenen Raumgruppe P6₅22 eine vom Wildtyp derart verschiedene Anordnung der Monomere, dass weite Bereiche des ursprünglichen *Interface* frei liegen. Das neue, artifizielle, kovalent über eine Disulfidbrücke verbrückte Dimer in der Kristallstruktur weist nach den Erkenntnissen von Stengl et al. [60] und Ritschel et al. [68] keinerlei enzymatische Aktivität auf, da die Stabilisierung der tRNA-Bindung durch die Reste Arg132, Lys125 und Arg77 auf der Seite des Dimerpartners nicht realisiert werden kann. Demgegenüber stehen die Ergebnisse des *in vitro* Assay, bei dem eine Restaktivität von etwa 25% bezogen auf k_{cat} festgestellt werden konnte. Offenbar erzwingt die Disulfidbrücke eine Enzymstruktur im Kristall, die in Lösung nicht so gegeben ist. Diese Form wird vermutlich nur unter oxidativen Bedingungen (Luftsauerstoff) gebildet. Möglicherweise tritt auch ein Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Form in Lösung auf. Die in der P6₅22-Struktur ausgebildete Disulfidbrücke kann leicht unter reduktiven Bedingungen aufgegeben werden, die dann getrennten Monomere können sich analog zum Wildtyp zusammenlagern. Wenn es aber zu einer Umorientierung zwischen der Lösungsform und der Kristallform kommt, so muss dies über eine gewisse Menge an intermediär auftretendem freien TGT Monomer in Lösung passieren. Dass dieses stabil in Lösung vorliegt, zeigen die nativen Massenspektren der TGT Varianten mit den Schlüsselmutationen W326E, F92C, Y330C bzw. Y330D. Der strukturelle Aufbau des freien Monomers ließ sich bisher allerdings nicht kristallographisch bestimmen.

Obgleich enzymkinetisch eine katalytische Umsatzrate gemessen werden kann, ist eine Aussage über die Bindestärke zwischen Enzym und tRNA nur begrenzt bzw. unter idealisierten Annahmen möglich. Zum einen stellt Guanin mit 10 μM einen

kompetitiven Inhibitor bezogen auf die tRNA-Bindung (Konzentration tRNA im Assay 0.5 μ M ... 15 μ M) an TGT (Konzentration im Assay 75 nM) dar, sodass die Grundvoraussetzung für die Michaelis-Menten-Kinetik des freien Enzyms nicht mehr gegeben ist. Vielmehr findet in Abhängigkeit der Substratkonzentration eine verschieden starke Hemmung der Bildung des Enzym-Substratkomplexes statt (gemessener K_M ist überhöht). Sobald die tRNA gebunden ist, verläuft die Reaktion mit Guanin wegen dessen großen Überschusses zum Produkt nach 0. Ordnung mit dem bestimmten k_{cat} ab. Die Variation der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit wird durch die Reduktion der aktiven Enzymkonzentration in Abhängigkeit der einzelnen Mutationen erreicht. Dieser Umstand wirkt sich der Michaelis-Menten-Kinetik zufolge direkt auf v_{max} aus und ist anstatt des Parameters k_{cat} die veränderliche Größe (obwohl nichtsdestotrotz eine direkte Proportionalität unter den Annahmen der MM-Kinetik besteht). Diesen Überlegungen folgend liegen im Vergleich zum Wildtyp bei TGT Y330C 50%, bei TGT F92C/C158S/C281S 25% und bei TGT W326E/E339Q 5% des eingesetzten Proteins als aktives Dimer vor.

Bei einer enzymkinetischen Messung werden zunächst alle TGT Bindetaschen sämtlicher Moleküle mit dem im Überschuss vorliegenden (3 H-)Guanin gesättigt. Gemäß dem Ping-Pong-Mechanismus der Basenaustauschreaktion muss jedoch tRNA zu Beginn des katalytischen Vorgangs an das Enzym binden und steht damit beim Start der Reaktion in Konkurrenz zu Guanin. Eine Bindung kommt somit nur zustande, wenn tRNA zusätzlich stabilisiert wird. Liegt ein Gleichgewicht zwischen der aktiven und einer bzw. mehreren inaktiven Konformationen des TGT Dimers vor, so kommt es zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichts, sobald durch die Bindung an tRNA die aktive Form des Enzyms im Komplex (TGT-Monomer-1)–(TGT-Monomer-2)–tRNA konserviert wird (quasi ein *induced fit* Effekt ausgelöst durch tRNA). Dies ist jedoch nur dann möglich, wenn nicht durch Umfaltung, Mutagenese oder Komplexbildung mittels Liganden eine der Dimerisierung entgegenstehende Proteinstruktur eingenommen wurde. Kombiniert man also den enzymkinetischen Assay mit den Aussagen der nativen nano-ESI Massenspektrometrie, so finden bei allen untersuchten TGT Varianten außer bei TGT Y330D lediglich reversible und/oder die Dimerisierung nur untergeordnet störende Veränderungen in der Gestalt des Monomers statt, sobald sich dieses frei in Lösung befindet. In TGT Y330D ist durch die zusätzliche Massedifferenz und die vollständige Inaktivität im enzymkinetischen Assay u.Ü. von einer irreversiblen Veränderung der Morphologie des TGT Monomers auszugehen.

Diese Aussagen decken sich mit den in dieser Arbeit gefundenen strukturellen Merkmalen einzelner TGT Varianten. Für TGT K52M, TGT C158S/C281S/W326E/E339Q, TGT F92C/C158S/C281S und TGT Y330C wurden jeweils im Loop-Bereich zwischen den Positionen 46 und 52 vom Wildtyp abweichende Konformationen gefunden (für eine Überlagerung vgl. Abbildung 3.38) und im enzymkinetischen Assay wurde eine signifikante Aktivitätsverringerung festgestellt (vgl. Tabellen 3.2 und 3.3). Alle sonstigen Sekundärstrukturelemente liegen weitgehend deckungsgleich wie im Wildtyp vor, einzelne Seitenkettenrotationen oder bewegliche Loop-Regionen an der Peripherie sind davon ausgenommen.

Betrachtet man die Überlagerung der bisher in den Kristallstrukturen beobachteten Loop-Konformationen in Abbildung 3.38 und nimmt den Verlauf im kristallisierten Wildtyp als Referenz, so zeigen alle im Kristall dimerisierten, in Lösung aber zumindest zum Teil monomerisierten Varianten den Loop relativ gesehen auf der linken Seite, die Variante TGT Y330C (P6₅22) mit dem funktional inaktiven Dimer platziert den Loop hingegen auf der rechten Seite. Dieser Unterschied ist durch die gewonnene räumliche Freiheit in der geänderten Kristallpackung von TGT Y330C (P6₅22) zu erklären. Es ist denkbar, dass diese Konformation eher einer in Lösung eingenommenen Geometrie entspricht, da im Schleifenbereich keine Kontakte zu anderen Atomen ausgebildet werden (soweit in der Struktur zu erkennen). Würde man diese Loopkonformation bei einer C2-symmetrischen Zusammenlagerung beider Monomere gemäß dem Wildtyp aufeinander zwingen, so müsste es zu sterischen Konflikten im Dimerkontakt kommen. In Abbildung 3.39 sind diejenigen Aminosäuren rot eingefärbt, die bei einem solchen Kontakt in das andere Monomer hineinragen. Das Einfügen eines Liganden zur Stabilisierung dieser die Bildung des aktiven Dimers blockierenden Konformation, die möglicherweise so auch in Lösung eingenommen wird, wäre eine gute Variante, einen PPI-Inhibitor für die TGT zu entwickeln.

Die Veränderung zwischen monomerer und oligomerer Struktur der Polypeptidkette diskutieren auch Keskin et al. ^[31]: Am Beispiel des Lysin-Bindeproteins (pdb-Codes: 2LAO (apo) und 1LST (gebunden)) zeigen die Autoren eine mögliche Domänenbeweglichkeit und an einem zweiten Beispiel der Glutathion-S-Transferase-I eine konformative Loop-Beweglichkeit (pdb-Codes: 1AW9 (apo) und 1AXD (gebunden)), die unter dem Einfluss der Bindung eines Kleinmoleküls stattfindet. Dass die Bindung an Proteine mit großen Kontaktflächen zu eben solchen Veränderungen in der Lage ist, steht außer Frage und konnte im Rahmen dieser Arbeit am Beispiel der TGT illustriert werden.

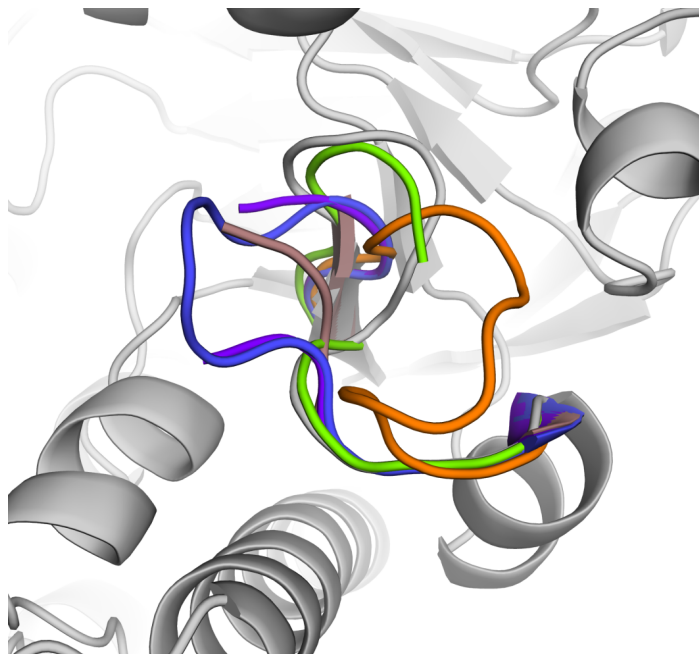


Abbildung 3.38: Darstellung aller in dieser Arbeit erläuterten Loopkonformationen der Aminosäuren 46 bis 52. Farbschema: TGT Wildtyp - 1PUD (grau), TGT K52M - 4DXX (A) (rosa), TGT C158S/C281S/W326E/E339Q - 3UVI (blau), TGT F92C/C158S/C281S - 4DY1 (violett), TGT Y330C in P6₅22 - 4JBR (orange), TGT Y330C in C2 - 4HTB (grün). Man kann grob die drei Varianten Mitte (z.B. 1PUD), links (z.B. 3UVI) und rechts (4JBR) unterscheiden.

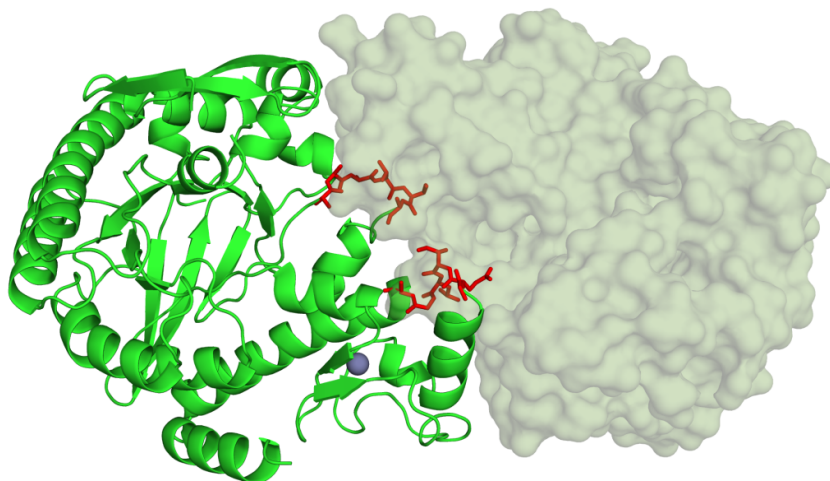


Abbildung 3.39: Theoretische Anordnung zweier TGT Y330C Monomere aus 4JBR in der C2-Geometrie des TGT Wildtyps: Bedingt durch die geänderte Loopkonformation kommt es zu Behinderungen in den rot eingefärbt dargestellten Bereichen (Aminosäure 47 bis 52 sowie 338 bis 343), die in das andere Monomer (Oberflächendarstellung) hineinragen würden. Eine Dimerbildung ohne Umfaltung ist damit ausgeschlossen.

Allerdings besteht nur dann die Möglichkeit, einen PPI-Inhibitor an der Kontaktfläche eines Monomers zu platzieren, wenn das Dimer dissoziiert und zwischenzeitlich eine für die Ligandenbindung günstige Konformation einnimmt.

Homodimere gelten allgemein als permanente Oligomere, deren Faltung bereits als kooperatives Phänomen des Komplex als Ganzes gesehen wird. ^[31,48] Dies macht eine Dissoziation unwahrscheinlich oder es muss zumindest angenommen werden, dass weite Teile des *Interface* nach Monomerisierung nicht stabil sind und es zu Umfaltungen kommt. Auch reagiert ein solcher Faltungsmechanismus sensibel auf Mutationen, da einzelne Aminosäuren nicht nur zur Stabilisierung des Oligomers, sondern u.Ü. zur Stabilisierung der lokalen Umgebung und damit zur Ausprägung der Sekundärstrukturmerkmale im benachbarten Monomer beitragen. ^[114,115] Am Beispiel der TGT konnte in der hier vorgestellten Studie an vier ausgewählten Mutationspunkten entlang der Kontaktfläche der beiden Monomere das Gegenteil gezeigt werden: Die Struktur der Polypeptidkette wird durch die Mutationen in weiten Teilen nicht beeinflusst (abgesehen vom Schleifenverlauf zwischen Position 46 und 52). Weiterhin ist auf Grund der C2-symmetrischen Anordnung der beiden Monomere im funktionalen Enzym eine wechselseitige Beeinflussung der Faltung bei der Proteinproduktion in der Zelle nicht möglich, eine kooperative Faltung scheint deshalb ausgeschlossen. Demgegenüber steht zunächst der signifikant hydrophobe Charakter des *Interface* (39.3% polare Oberfläche) verglichen mit der Oberfläche des Dimers (52.7% polare Oberfläche), der eine Einbeziehung in die hydrophobe Stabilisierung des globulären Enzyms wahrscheinlich macht. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass für TGT nach einer erfolgreichen Monomerisierung in Lösung (durch native nano-ESI MS nachgewiesen) eine Rekonstruktion des funktionalen Enzymkomplexes unter Ausbildung einer für die Dimerisierung günstigen Konformation (durch Röntgenstrukturanalyse nachgewiesen) weiterhin möglich ist. So wird trotz deutlicher Schwächung des *Interface* im funktionalen Dimer im Falle der Festkörperbildung weiterhin die Kontaktfläche realisiert. Offensichtlich stellt die Packung über eine zweizählige Symmetrie ein Optimum dar. Eine Denaturierung in Lösung in Folge der Monomerisierung kann somit ausgeschlossen werden. Zhao et al. ^[116] entdeckten mit dem Protein BirA aus *E.coli* einen bispezifischen Komplexbildner, der sowohl ein Homodimer wie auch mit BCCP ein Heterodimer bildet. In diesem Fall findet die Adaption der Geometrie über an der Oberfläche gelegene Loops statt, die die Bindung an den jeweiligen Komplexpartner über eine intrinsische Flexibilität regulieren. Dort wurde auch gezeigt, dass die Homodimerbildung

keineswegs stets zu einem permanenten Komplex führt. Nooren und Thornton^[117] klassifizierten Protein-Protein-Komplexe als obligat, wenn sie strukturell wie funktional unselbstständige Einheiten bilden, die in monomerer Form einer strukturellen Auflösung unterliegen und somit Inaktivität zeigen. Für Homodimere wird dies als der Regelfall genannt. Nichtobligate Homodimere sind den Autoren nach selten, allerdings sind Beispiele bekannt (Sperm-Lysin^[118]). Die Unterscheidung zwischen einer permanenten Komplexbildung und einer stetigen Dissoziation in Monomere unter anschließender Neuausbildung des Dimers ist nur mittels Markierungsexperimenten mit unterschiedlich präparierten Chargen A und B möglich, bei denen es durch Einstellung der Gleichgewichtsbedingungen zwischen den drei möglichen Komplexen AA, BB und AB/BA zu messbaren Eigenschaftsveränderungen nach Zusammenfügen beider Chargen kommt. Dabei dürfen sich jedoch A und B nur in sofern unterscheiden, dass die ursprünglichen Gleichgewichtsbedingungen nicht verändert werden (z.B. keine Faltungsbeeinflussung, keine Löslichkeitsveränderung usw.). Geeignet wären hierfür z.B. die Veränderung der Proteinmasse durch Einbau von ^{15}N angereicherten Aminosäuren durch Expression in einem speziellen Medium und anschließender massenspektrometrischer Messungen unter nicht degradierenden Bedingungen oder die anfügung eines unfunktionalen Tags. Cardinale et al.^[48] diskutieren in ihrem Review unterschiedlich stark gebundene Homodimere (z.B. HIV-IN K_D 25 μM , TIM K_D 0.01 nM) hinsichtlich dieser Eigenschaften und beschreiben bisher verfügbare PPI-Inhibitoren sowie Methoden zur Charakterisierung der Austauschkinetiken. Sie verweisen darin auf Probleme, die bei der Messung der Dissoziationskonstanten für stark bindende Komplexe auftreten und vergleichen die Möglichkeit der Berechnung von $\Delta^i G$ bzw. K_D für die *Interface*-Bildung mit PISA^[97] mit experimentell ermittelten Werten aus der Literatur. Dabei erreicht die theoretische Abschätzung in allen sechs betrachteten Fällen eine direkte Korrelation zur Größenordnung der experimentellen Werte. Für den TGT Wildtyp (pdb-Code: 1PUD) berechnet PISA eine Dissoziationsenthalpie von $-16.7 \text{ kcal mol}^{-1}$, was in etwa dem Wert für das Dimer der HIV-Integrase (HIV-IN) entspricht. Für diesen Homodimerkomplex sind sowohl Peptide, Peptidomimetika als auch Kleinmoleküle als PPI-Inhibitoren bis in den nanomolaren Bereich mit guten Inhibitionseigenschaften bekannt.

Die Varianten TGT F92C/C158S/C281S und TGT Y330C sollten auch dazu dienen, die Bindungseigenschaften des TGT Homodimerkomplex näher zu analysieren und den Einfluss des aromatischen Clusters, der sich in doppelter Form mit Trp326, Tyr330, Phe92' und His333 über beide Monomere direkt am *Interface* erstreckt, aufzuklären.

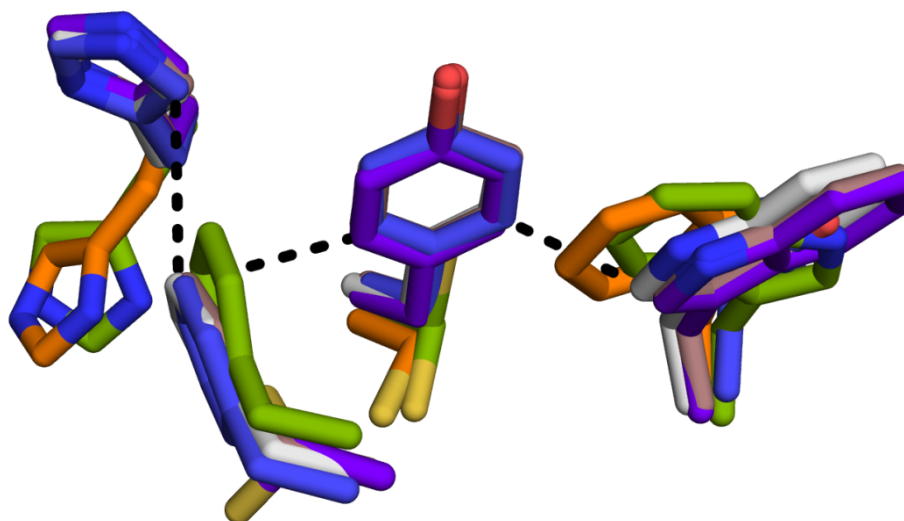


Abbildung 3.40: Vergleich der strukturellen Ausprägung der aromatischen Cluster aller besprochenen TGT Varianten. Farbschema: TGT Wildtyp - 1PUD (grau), TGT K52M - 4DXX (A) (rosa), TGT C158S/C281S/W326E/E339Q - 3UVI (blau), TGT F92C/C158S/C281S - 4DY1 (violett), TGT Y330C in P6₅22 - 4JBR (orange), TGT Y330C in C2 - 4HTB (grün). Signifikante Veränderungen treten mit Drehung an Trp326 und His333 nur bei der Mutation Y330C auf.

Die massenspektroskopischen Untersuchungen bewiesen, dass durch Austausch einer einzelnen der drei Aminosäuren Trp326, Tyr330 und Phe92' gegen eine nichtaromatische Seitenkette der Komplex so weit destabilisiert wird, dass er in Lösung zum überwiegenden Teil zerfällt. Mit TGT Y330F ist weiterhin eine Mutation bekannt, bei der nur ein sehr geringer Effekt im nano-ESI Massenspektrum beobachtet werden konnte. [68] Ob innerhalb des Clusters kooperative Effekte vorhanden sind bzw. ob Kompensationen bei Verminderung des aromatischen *Stackings* eintreten, kann durch eine Überlagerung aller relevanten Strukturen ermittelt werden (Abbildung 3.40). Die mittig im Cluster platzierten Aminosäuren Phe92' und Tyr330 reagieren in ihrer räumlichen Lage nicht auf Veränderungen der unmittelbaren Umgebung und befinden sich untereinander ungestört in einer *edge-to-face* Wechselwirkung, die nur durch Mutation dieser Aminosäuren oder, bedingt durch die kovalente Disulfidverbrückung in 4JBR so stark in der Distanz aufgeweitet wird, dass kein Komplex mehr entsteht.

His333 sowie Trp326 sind in ihrer Ausrichtung jedoch flexibel. Bedingt durch die Platzierung am Rand des Clusters kommt es im Fall der Mutation Y330C bei Trp326 zu einer 180° Drehung, während His333 ca. 110° gegen den Uhrzeigersinn um die C_α-C_β Achse rotiert. Mit dem Ersatz des p-Hydroxyphenylrings gegen Schwefel an Position

330 wird ein Volumen freigegeben, das mit der sterisch anspruchsvollen Seitenkette des Tryptophans gefüllt werden kann. Dabei ergeben sich auch neue Möglichkeiten, Wasserstoffbrückenbindungen am Heterozyklus auszubilden: In Raumgruppe C2 werden – verbrückt über Wassermoleküle – die Carboxylgruppen an der Seitenkette von Glu57' sowie an der Hauptkette von Ala321 adressiert. In Raumgruppe P6₅22 erfolgt wahrscheinlich die Absättigung durch Wassermoleküle aus dem freien Sovens (nicht kristallographisch bestimmt). Die Rotation von His333 kann über die fehlende Wechselwirkung zur Aminosäure 330 nach Austausch von Tyrosin gegen Cystein erklärt werden. In der im Wildtyp eingenommenen Konformation ist der Abstand der aromatischen Zentren bei ca. 5 Å. Der resultierende Winkel ergibt sich zum einen daraus, dass das *Stacking* zu Phe92' aufrecht erhalten werden soll (allerdings nur in der Raumgruppe C2) und günstige Interaktionen zum Dimerpartner an Ala48' (in Raumgruppe C2) bzw. einem Wasserstoffbrückennetz (in Raumgruppe P6₅22) bestehen. Eine eindeutige Kooperation in der geometrischen Anordnung lässt sich daher nicht ableiten, allerdings wurde die Auswirkung einer Mutation an His333 bisher noch nicht untersucht und sollte zur Vervollständigung der Betrachtungen in Zukunft ergänzt werden.

Am Beispiel der TGT konnte an Hand einer computerunterstützten Mutationsstudie gezeigt werden, dass ein Cluster aromatischer Aminosäuren die entscheidende *Hot-Spot*-Region am *Interface* des Homodimerkomplexes darstellt. Die Besonderheit liegt darin, dass der Cluster erst durch Komplexierung mit dem Dimerpartner durch den bereitgestellten Rest Phe92' komplettiert wird. Durch konservative Suchalgorithmen, die lediglich auf der Oberfläche eines der beteiligten Monomere eine *Hot-Spot*-Analyse durchführen, würde dieser Kontakt nicht gefunden werden können. Mit der von Kannan et al. vorgestellten Methode des *graph spectral clustering* in Kombination mit einer eindeutigen Kettenzuordnung wäre eine explizite Suche nach Clustern aromatischer Aminosäuren in Kontaktflächen bekannter Proteinkomplexe einfach möglich. [118,119] Bei der Anwendung dieser Suchmethodik auf thermophile Proteine aus unterschiedlichen Familien konnten je Enzym bis zu acht Cluster mit zwei oder mehr Mitgliedern gefunden und deren stabilisierende Auswirkung im Vergleich zu verwandten, mesophilen Proteinen aufgeklärt werden. Der herausgehobene Einfluss aromatischer Aminosäuren in PPIs ist allgemein akzeptiert und wurde in Reviews bereits ausführlich besprochen. [120] Die vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten, die π - π -*Stacking*, Kation- π -*Stacking*, hydrophobe Kontakte und Wasserstoffbrückenbindungen der Heteroaromaten Histidin und Tryptophan sowie an der Hydroxylgruppe des Tyrosin umfassen, lassen ihren Einbau

in Protein-Protein-Kontaktflächen besonders günstig erscheinen. Derartige Tendenzen wurden auch für andere Proteine in jüngster Zeit festgestellt. ^[121] Wie hier am Beispiel der TGT gezeigt werden konnte, wird zusätzlich durch aromatische Cluster, deren Nahordnung durch aromatische Wechselwirkungen determiniert wird, die Spezifität der Protein-Protein-Erkennung im *Hot-Spot*-Bereich ausgebildet. Für die Entwicklung potenter PPI-Inhibitoren sollten derartige aromatische Bereiche in Zukunft besondere Beachtung finden.

3.7 Ansätze zur Entwicklung eines PPI-Liganden mittels in silico unterstützten, kovalenten Tetherings

Die Suche nach einem geeigneten Inhibitor zur Platzierung an der Oberfläche eines Proteins setzt zunächst einen Bereich am Enzym voraus, der potentiell als Bindungsregion zur Verfügung steht. Im Allgemeinen eignen sich dazu Bindetaschen, die eine geometrische Form für den Liganden vorgeben, Bindungspartner auf atomarer Ebene bereitstellen und den Zutritt von Solvensmolekülen derartig begrenzen, dass eine Erhöhung elektrostatischer Wechselwirkungen durch eine niedrige Dielektrizität der direkten Bindungsumgebung gegeben ist. ^[2] Am *Interface* einer Protein-Protein-Interaktion ist die Oberfläche der Bindungspartner hingegen eher flach ausgebildet und geeignete Bindetaschen sind häufig nicht präsent. Um trotz dieses Umstands effektive PPI-Inhibitoren bereitzustellen, wurden verschiedene Möglichkeiten entwickelt, um entweder größere Bindetaschen zu erfassen bzw. zu generieren ^[1,83,122] oder aber um zunächst kleine Taschen mit der Besetzung durch Fragmentmoleküle zu nutzen und im Nachgang mehrere potente Bindungspunkte durch Verknüpfung zu einem großen Liganden zusammenzufassen bzw. entlang der Oberfläche zu wachsen. ^[2,19,22,46,123] In dieser Arbeit wurden zwei mögliche Bindetaschen im *Interface*-Bereich bereits beschrieben, die durch die Beweglichkeit des Loops 46–52 ausgebildet werden. Während die eine Konformation grundsätzlich die Dimerisierung des Enzyms erlaubt (3UVI, 4DY1), ist sie durch sterische Hinderung im Falle der zweiten Konformation ausgeschlossen (4JBR). Der Ansatz, eine neu gefundene Tasche als Startpunkt für ein fragmentbasiertes Ligandendesign zu nutzen, wurde zu einem Zeitpunkt gewählt, zu dem lediglich Erkenntnisse zur ersten potentiellen Bindetasche vorlagen. Erste Ergebnisse hierzu werden in den folgenden

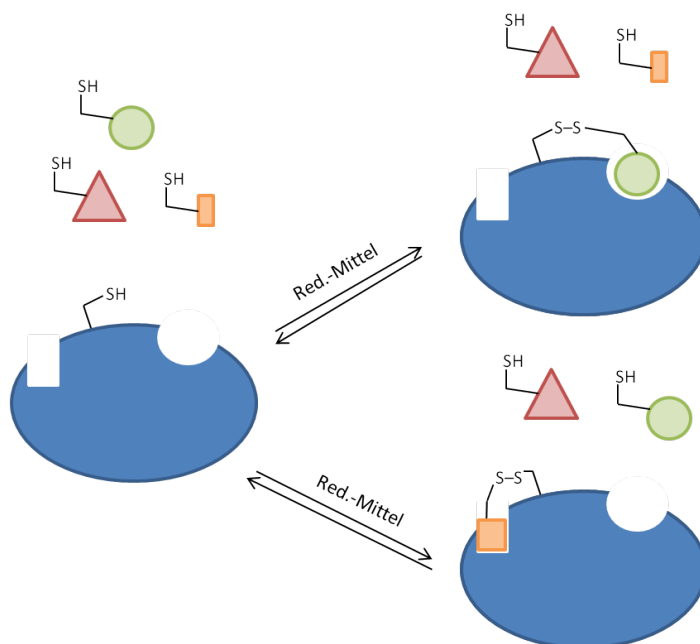


Abbildung 3.41: Schematische Darstellung des *Tethering* verschiedener Fragmentmoleküle an einen Rezeptor. Für jede Bindetasche gibt es ein spezifisches Molekül mit der höchsten Bindeaffinität. Der Cystein-Anker kann jedoch nur einfach besetzt werden, sodass auch nur die Bindung an eine der Taschen erfolgt, bzw. in einem Cocktail mehrerer *Tethering*-Fragmente eine Verteilung entsprechend des eingestellten Gleichgewichts vorliegt. (Abbildung in Anlehnung an [16])

Abschnitten gezeigt, die Methodik lässt sich sicher auf die zweite Taschenkonfiguration übertragen bzw. erweitern.

Für die initiale Fragmentsuche wurde die von Erlanson et al. [16] bei *Sunesis* entwickelte Methode des *Tetherings* angewendet, deren Möglichkeiten bereits durch zahlreiche Arbeiten gezeigt werden konnten [6,123–127]. Dabei wird das Fragment in Form eines Thiols an einen Cystein-Anker an der Oberfläche des Zielproteins gebunden. Unter Gleichgewichtsbedingungen in Anwesenheit eines Reduktionsmittels wie z.B. Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol (BME) wird eine hohe Affinität von Fragmenten zu einer stabileren Ausbildung der kovalenten Disulfidbindung führen, als bei weniger affinen Fragmenten. Die prozentualen Anteile des Proteins mit und ohne gebundenem Fragment werden ebenso von der Affinität beeinflusst, da die thermodynamische Stabilität des Systems mit der Gleichgewichtskonstante und folglich mit den Proportionen der vorhandenen Reaktanden wie in Gleichung 3.1 gezeigt miteinander verknüpft sind.

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K = -R \cdot T \cdot \ln \frac{c(TGT - Teth)}{c(TGT) \cdot c(Teth)} \quad (3.1)$$

Mit Hinblick auf einen *Interface*-Inhibitor ist es notwendig, den Cystein-Anker im Bereich der Kontaktfläche zu platzieren, sodass für diese die Affinität der gebundenen Fragmente untersucht werden kann. In der hier gezeigten Studie wurde zunächst eine geeignete Position zur Platzierung eines Cystein-Ankers in Zusammenarbeit mit Felix Terwesten gesucht und ein solcher mittels Mutagenese in das Protein eingebracht. Das resultierende Enzym wurde umfassend in einem Assay, mittels denaturierender sowie nativer nano-ESI Massenspektrometrie und Röntgenstrukturanalyse charakterisiert. Die resultierende Struktur wurde genutzt, um zunächst mittels eines *Dockings*, das Felix Terwesten ebenfalls im Rahmen seiner Diplomarbeit durchführte, Aufschlüsse über die Eignung einer in der Arbeitsgruppe vorhandenen Bibliothek von *Tethering*-Fragmenten^[96] zu erlangen. Die Ergebnisse wurden durch Molekulardynamiksimulationen gestützt, differenziert und erweitert. Schließlich wurden *Tethering*-Experimente an der Variante TGT F92C/C158S/C281S durchgeführt und dabei die Bindungsaffinität der *Tethering*-Fragmente über denaturierende Massenspektrometrie charakterisiert. Native nano-ESI Massenspektrometrie brachte wegen des hohen Monomerisationsgrads der TGT F92C/C158S/C281S keine signifikanten Ergebnisse. Eine röntgenkristallographische Charakterisierung war wegen der ungenügenden Kristallisation des mit einem *Tethering*-Fragment gebundenen Enzyms nicht möglich bzw. es wurden nur Strukturen ohne Fragment gefunden. In den nachfolgenden Sektionen sollen die einzelnen Schritte näher vorgestellt und abschließend miteinander verglichen sowie diskutiert werden.

Platzierung eines Cystein-Ankers im Interface-Bereich

Die Rahmenbedingungen für ein aussagekräftiges *Tethering*-Experiment werden zum einen durch die Auswahl der Fragmente für den Bibliotheksentwurf, zum anderen von der Auswahl des *Tethering*-Cystein-Ankers am Enzym geschaffen. Da zunächst mit einer vorhandenen Bibliothek gearbeitet wurde, musste lediglich die Vorbereitung der TGT erfolgen. Dazu wurde zunächst eine Analyse der Zugänglichkeit vorhandener Cysteine für *Tethering*-Fragmente mittels PISA und visueller Inspektion durchgeführt. In TGT sind fünf Cystein-Reste vorhanden. Drei davon bilden im Inneren des Enzyms zusammen mit His349 die Koordinationssphäre des strukturellen Zinkions. Sie sind von außen nicht zugänglich und in ihrer Position durch die koordinative Bindung fixiert.

Zwei weitere Cysteine befinden sich in der tRNA-Bindetasche und sind mit 21.60 \AA^2 (Cys158) bzw. 24.95 \AA^2 (Cys281) an der zugänglichen Oberfläche des TGT Wildtyps (1PUD) beteiligt. Außerdem nimmt Cys281 gemäß den Ergebnissen von Xie et al. an der Bindung zur tRNA teil. [55] Um eine unbeabsichtigte Bindung von *Tethering*-Fragmenten an diese beiden Cysteine zu vermeiden, wurde entschieden, diese zunächst jeweils gegen Serin auszutauschen. Sterischer Anspruch und die Fähigkeit Wasserstoffbrücken zu bilden, werden durch den Austausch der Thiol- gegen eine Hydroxylgruppe nicht signifikant beeinflusst, wohingegen die Ausbildung einer kovalenten Verknüpfung mit einem weiteren Thiol nicht mehr gegeben ist. Die Mutationen wurden bereits in einem frühen Stadium des Projekts umgesetzt, sodass eine kristallographische Charakterisierung durch die Variante TGT C158S/C281S/W326E/E339Q erfolgen konnte. Im Zuge der Mutation C281S kommt es lediglich zu einer Rotation der Seitenkette um ca. 38° . Beim Austausch C158S verändert sich der Verlauf der Hauptkette leicht um ca. 1.6 \AA (C_α - C_α -Abstand) sowie die Seitenkettenorientierung an Tyr106 (Rotation um ca. 96° in Richtung des freien Solvens) und Met109 (ebenfalls Rotation um ca. 93° in Richtung des freien Solvens). Dadurch stellen sich Teile der tRNA-Bindetasche anders dar. Bei einem vergleichenden Assay von TGT Wildtyp und TGT C158S/C281S konnte eine Zunahme in k_{cat} (ca. 35%) und K_M (ca. 30%) beobachtet werden. Im Vergleich zu den Veränderungen der Assaywerte durch die Mutationen im *Interface*-Bereich sind diese jedoch als gering zu bewerten. Die Mutationen an den Positionen 158 und 281 von Cystein zu Serin haben also keine signifikante Auswirkungen auf die Struktur und Funktionalität des Enzyms und beeinträchtigen die Übertragbarkeit weiterführender Experimente vermutlich nicht.

Bei den Überlegungen zur Platzierung des Cystein-Ankers im *Interface*-Bereich der TGT konnte zum einen auf die Kristallstruktur der Variante TGT C158S/C281S/W326E/E339Q (3UVI) zurückgegriffen werden, zum anderen wurde ein virtuelles TGT-Monomer mittels Molekulardynamiksimulation in einem *solvent mapping*-Verfahren nach Seco et al. [83] auf mögliche Bindetaschen hin überprüft.

Die in Kapitel 3.3 umfassend beschriebene Kristallstruktur zeigt im Bereich des *Interface* eine Tasche, die sich durch die Verlagerung des Loop zwischen den Positionen 46 und 52 öffnet und mit einem Iodidion an zwei alternativen Positionen sowie einem Netzwerk aus sechs Wassermolekülen besetzt ist. In die Tasche ragt außerdem das andere Monomer mit den Resten His333' und Tyr330' hinein (vgl. Abbildung 3.24). Durch die Platzierung eines starken Liganden in diesem Bereich könnte zum einen die Position des Loops

stabilisiert und zum anderen der zur Verfügung stehende Raum in der Tasche so ausgefüllt werden, dass eine Dimerisierung der TGT verhindert wird.

Die Ableitung von Affinitätsprofilen eines Proteins allein aus statischer Strukturaufklärung vernachlässigt jedoch u.Ü. auftretende, transiente Bindetaschen, die durch einen bindenden Liganden stabilisiert werden können und so in einen langlebigen Zustand überführt werden. Ein dynamisches *solvent mapping* kann *in silico* dazu beitragen, diesen Effekt abzubilden und derartige Bindetaschen sichtbar zu machen. Bisherige Ansätze von Seco et al., einen Teil des wässrigen Solvens durch Isopropanol zu ersetzen, zeigten gute Ergebnisse und ließen über eine Verteilungsfunktion sogar eine quantitative Abschätzung von Bindungsenergien zu. Für die TGT stand zunächst die Frage im Vordergrund, ob mit der Methode ‚versteckte‘ Bindetaschen im *Interface*-Bereich aufgezeigt werden können. Dazu wurde in einem Solvensmix H₂O/iPrOH (4:1) das Monomer des TGT-Wildtyp (1PUD) über einen Zeitraum von 50 ns frei simuliert und anschließend die Verteilung der iPrOH-Moleküle getrennt nach den funktionellen Gruppen (Methyl=hydrophob, -OH= Wasserstoffbrückendonator) in *ptraj* ermittelt. Die Abbildung 3.42 zeigt in rot solche Positionen, an denen ein entsprechendes Sauerstoffatom mindestens fünf mal so häufig während der Simulation anzutreffen ist, als über den gesamten Raum des Solvens gemittelt. Für die Kohlenstoffatome (blau) wurde das Maß auf eine 10fache Häufigkeit angepasst, da diese je Molekül zweifach vorhanden sind. Aus der Abbildung können visuell fünf Bereiche mit erhöhter Aufenthaltshäufigkeit für beide Atomtypen in fünf Cavitäten festgestellt werden, von denen jedoch nur der mit **1** bezeichnete Bereich im *Interface* des TGT-Enzyms liegt. Die umgebenden Aminosäuren sind Ala53, Arg289, Ala343, Met344 und Thr347. Bis auf Thr347 wurden alle diese Aminosäuren in der *Hot-Spot*-Analyse in Kapitel 3.1 untersucht und nicht als signifikante Affinitätszentren charakterisiert. Das Volumen dieser potentiellen Bindetasche ist darüber hinaus für die Platzierung eines Startliganden im strukturbasierten Wirkstoffdesign zu klein. Auch handelt es sich nicht um eine Bindestelle, die auf den Einfluss eines stabilisierend wirkenden organischen Liganden zurückzuführen ist, sondern schon aus der Röntgenstruktur abgeleitet werden kann. Die konformative Veränderung im Loopbereich 46 bis 52 ließ sich in der Simulation nicht beobachten, tritt allerdings gemäß den bisher gemachten Beobachtungen höchstwahrscheinlich im Zuge der Monomerisierung des Enzyms auf.

Deshalb wurde diese Tasche verworfen und beschlossen, die potentielle Bindetasche aus der Struktur TGT C158S/C281S/W326E/E339Q mit den vorhandenen *Tethering*-

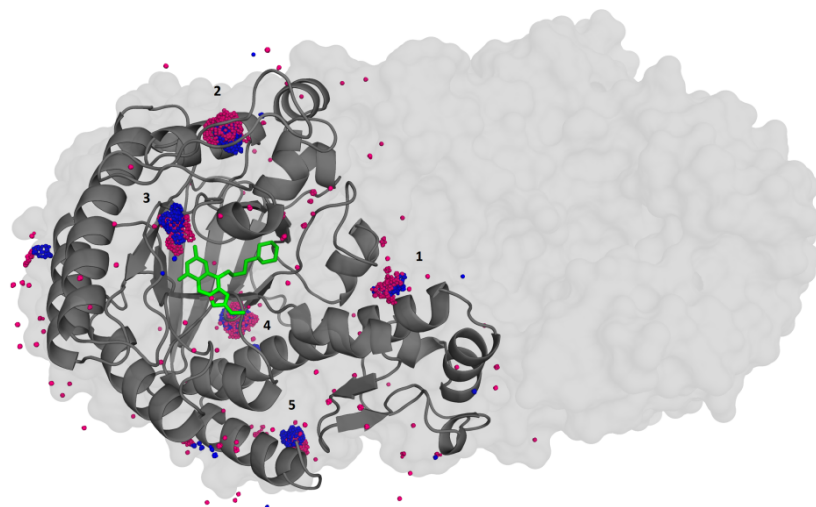


Abbildung 3.42: *Solvent mapping* eines TGT Wildtyp Monomers (grau, Struktur zum Endpunkt der Simulation nach 50 ns) mit iPrOH nach der Methode von Seco et al. In rot ist die Verteilung der Donorfunktionalität (min. 5-fach über dem Durchschnitt), in rot die Verteilung der hydrophoben Methylgruppen (zweimal je Molekül vorhanden, deshalb min. 10-fach über dem Durchschnitt). Von den visuell abgeleiteten Affinitätsbereichen (1: A53, R289, A343, M344, T347; 2: M75, R132, H133, M134, L135, R139, I143; 3: G105, M109, Q117, F155, E157; 4: M1, V2, A19, G28, T29, R38, R362, S366; 5: W296, K360, D376, F377, R380) liegt nur der erste am *Interface* (durch die transparente Oberflächendarstellung angedeutet). Die Lage der Substratbindetasche ist durch einen Liganden (grün, entnommen aus 3EOS) angedeutet.

Fragmenten auszuleuchten und günstige Positionen für die Platzierung einzelner *building blocks* eines Liganden zu finden. Bei der Wahl des notwendigen Cystein-Ankers ist zum einen eine relative Nähe zur Tasche zu berücksichtigen, zum anderen soll diese jedoch durch den Austausch nicht signifikant verändert werden. Auch sollte ein Einfluss des Cysteinaustauschs auf die Stabilisierung des TGT Dimer vermieden werden.

Felix Terwesten untersuchte hierzu die Variante TGT I340C. Position 340 liegt exponiert im *Interface*-Bereich des Enzyms, sodass gebundene Fragmente mit einem entsprechenden Linker die Tasche erreichen könnten. Jedoch hat sich gezeigt, dass es nach der Mutation an Luftsauerstoff zur spontanen Dimerisierung zweier Polypeptidketten kommt und nach Aufarbeitung des Proteins in der denaturierenden Massenspektrometrie ein kovalentes Dimer mit der doppelten Masse des angestrebten TGT I340C Monomers gefunden wird. Durch die Nähe von Ile340 zur Symmetrieachse ist die Ausbildung der Disulfidbrücke stark begünstigt sein, da hierfür keine vom

Wildtyp abweichende Konformation eingenommen werden braucht. Eine strukturelle Charakterisierung scheiterte an der Qualität der erhaltenen Kristalle. ^[128]

Aus diesen Ergebnissen wurde abgeleitet, dass besonders exponierte Positionen zum Platzieren des Cystein-Ankers für das *Tethering* eher ungeeignet sind. Dies konnte im späteren Verlauf auch durch die Variante TGT Y330C untermauert werden, da diese ebenfalls ein kovalent gebundenes Dimer ausbilden kann (vgl. Kapitel 3.5). So wurde Phe92 für den Austausch ausgewählt. Dies bildet an einer Seite den Abschluss der Tasche, sodass nach der Mutation F92C weite Teile der Tasche unverändert vorliegen sollten. Außerdem liegt Position 92 in einem Bereich des *Interface*, der eine kovalente Dimerisierung unter Ausbildung einer Disulfidbrücke aus sterischen Gründen unwahrscheinlich erscheinen lässt. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass Phe92 ein Teil des aromatischen *Hot-Spot*-Clusters darstellt und durch die Mutation eine Destabilisierung des TGT Dimers zu erwarten ist. Dies konnte, wie oben beschrieben, letztlich nach erfolgter Mutagenese, Expression mittels nativer nano-ESI Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Die anschließende kristallographische Charakterisierung bestätigt zudem den übereinstimmenden Schleifenverlauf zwischen den Positionen 46 und 52 im Vergleich zur Variante TGT C158S/C281S/W326E/E339Q, sowie die Lage des eingebrachten Cysteins.

Andere, u.Ü. geeignete Positionen könnten Ala53, Lys55, Arg82 und Leu86 darstellen, wobei die drei letztgenannten gemäß den Ergebnissen aus Kapitel 3.1 einen starken Einfluss auf die Dimerisierung ausüben (vgl. Abbildung 3.5). Ala53 liegt zudem in unmittelbarer Nähe zum besonders angeordneten Schleifenbereich, sodass dessen Beeinflussung durch ein *Tethering* an Position 53 nicht auszuschließen ist (vgl. auch Diskussion zu Abbildung 3.4).

Docking und Molekulardynamiksimulation

Umfangreiche *Screenings* von Bibliotheken mit wirkstoffähnlichen Testmolekülen (übliches HTS - *High Throughput Screening*) erfordern allgemein einen hohen Material- und damit Kostenansatz sowohl auf der Seite des Rezeptors – das Enzym muss u.Ü. aufwändig exprimiert, extrahiert, aufgereinigt oder/und chemisch vorbereitet werden – als auch auf der Seite der Liganden. Weiterhin muss ein HTS-geeigneter Assay mit leicht zu beobachtendem Messignal vorhanden sein bzw. etabliert werden. Um eine große chemische Vielfalt und Diversität mit gleichzeitig genügender Validierung der Ergebnisse zu erzielen, ist i.d.R. eine Vielzahl von Liganden notwendig, die aufwändig

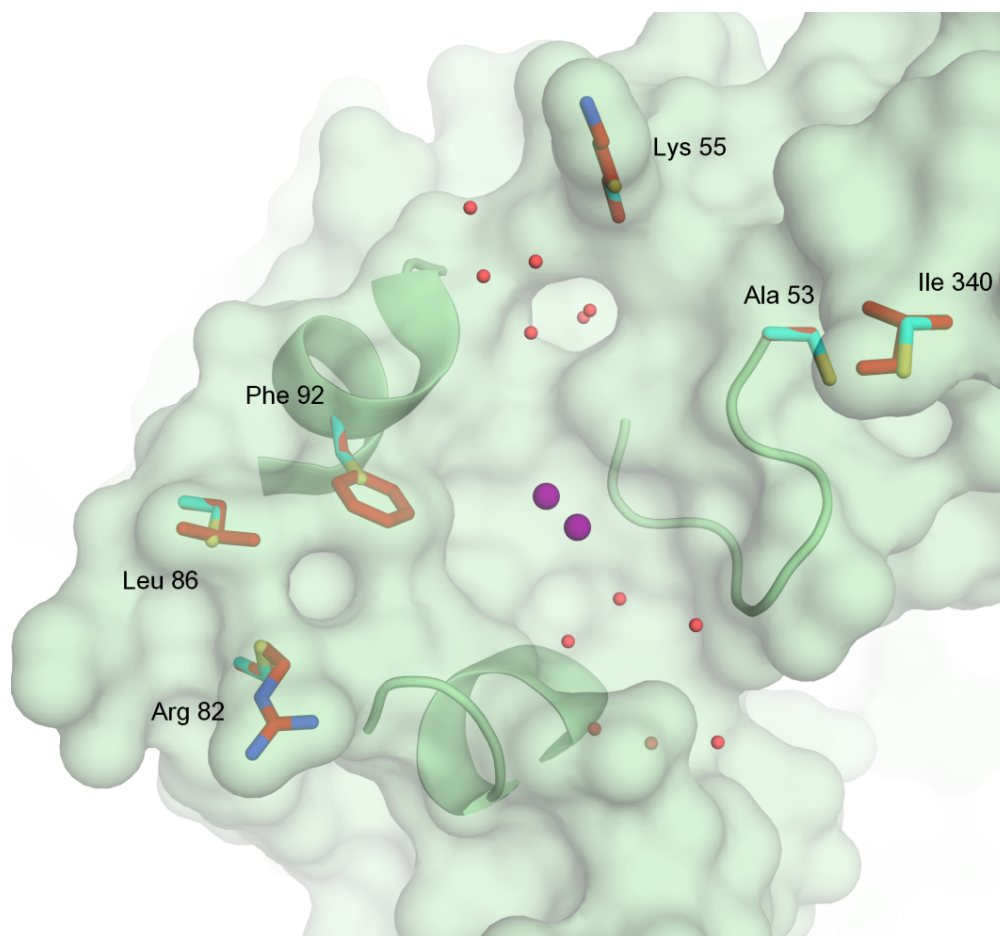


Abbildung 3.43: Mögliche Positionen für *Tethering*-Anker in der Umgebung der in unmittelbarer Nähe des *Interface* liegenden Tasche der Variante TGT C158S/C281S/W326E/E339Q (3UVI). Für die in rot dargestellten Aminosäuren Ala53, Lys55, Arg82, Leu86, Phe92 und Ile340 wurden die Seitenketten zusätzlich als Cystein-Mutation modelliert (cyan).

beschafft, vorbereitet, gelagert und katalogisiert werden müssen. Fragmentbibliotheken bieten dabei zwar den Vorteil einer guten chemischen Bandbreite bei geringen Stückzahlen, wegen ihrer geringeren Affinität bestehen jedoch hohe Anforderungen an die Methode zur Bindungsidentifikation.^[129] Deshalb hat sich in den letzten zwei Dekaden die Variante des *Virtual Screenings* etabliert, bei der *in silico* Rezeptor und Ligand zusammengebracht werden und deren Interaktion durch ein *Scoring*-Verfahren bewertet wird.^[2,22] Ein sogenanntes *Docking* passt beispielsweise ein Molekül in vielen Posen in eine Bindetasche ein, die Bewertung wird anschließend über die Summation kraftfeld- oder wissensbasierter Paarpotentiale für alle berücksichtigten Wechselwirkungen durch-

geführt. Zugunsten einer Vielfalt der geometrischen Platzierungen werden dabei häufig Faktoren wie Proteinflexibilität, Einflüsse von Wasser- oder anderen Solvensmolekülen sowie die nichtadditive Eigenschaft von Beiträgen zur Bindungsaffinität vernachlässigt. Die Unterstützung eines *Tethering*-Ansatzes zur fragmentbasierten Ligandensuche über ein *Docking* konnte bereits am Beispiel der Carboanhydrase II gezeigt werden.^[96,130] Für die TGT soll im Rahmen dieser Arbeit die Anwendbarkeit im *Interface*-Bereich eines Protein-Protein-Kontakts sowie die Erweiterung durch die Molekulardynamiksimulation getestet werden. Dabei wird, mit einigen Ausnahmen, auf die gleiche Bibliothek wie in der Dissertation von Johannes Schulze-Wischeler^[96] zurückgegriffen (Darstellung der Bibliothek mit Fragmentnamen und chemischen Formeln findet sich in Tabelle 3.6 sowie Anhang D).

Das kovalente *Docking* der potentiell verfügbaren Fragmente in Kombination mit verschiedenen langen Linkern, die der Anbindung an den Cystein-Anker dienen, führte Felix Terwesten im Rahmen seiner Diplomarbeit durch.^[128] Dabei konnte er zeigen, dass eine Platzierung der kovalent gebundenen Moleküle nur dann möglich ist, wenn eine ausreichend dimensionierte Bindetasche, wie bei den Varianten TGT F92C/C158S/C281S bzw. TGT C158S/C281S/W326E/E339Q, vorhanden ist. Demgegenüber werden beim Wildtyp viele Posen auch für außerhalb liegende Bereiche generiert. Die Bewertung der ‚korrekt‘ platzierten Posen konnte *a priori* nur schwer für Aussagen zur Bindungsaffinität genutzt werden, da viele Platzierungen einen ähnlich *Score* aufwiesen. Durch *Clustering* und *Rescoring* mittels *fconv*^[131] und den DrugScoreX^{CSD}-Potentialen^[132] wurden die Ergebnisse verfeinert und unter den 47 Fragmenten sechs (12.8%) besonders schlechte Kandidaten (Az21(=Az31), Az22, BO333, SB104, SB106, SB127 jeweils für alle Linkerlängen) sowie ein besonders guter Kandidat (TK099) identifiziert. Durch die Betrachtung der Anzahl divergierender Cluster wurden weitere sechs (insgesamt 14.9%) besonders gute Fragmente (SB097, SB107(=TK173), TK100, TK101, TK102, TK105 jeweils mit allen Linkerlängen) mit niedriger Clusteranzahl identifiziert.

Unabhängig von der realen Bindeeigenschaft liefert das *Docking* stets eine Lösung, deren Bewertung allein nicht unmittelbar auf die Qualität rückschließen lässt. Nichtsdestotrotz kann z.B. die beste Lösung eines jeden Fragments als Startstruktur für eine verfeinernde Molekulardynamiksimulation genutzt werden. Für alle als aussichtsreich identifizierten Fragmente wurde die jeweils beste *Docking*-Lösung ausgewählt und unter dem Einfluss des expliziten TIP3-Wassersmodells in AMBER über zwanzig Nanosekunden simuliert. Damit wurde das Ziel verfolgt, eine möglichst umfassende Beschreibung der intermole-

kularen Kräfte in die *in silico* Abbildung der Fragment-Rezeptor-Wechselwirkungen einfließen zu lassen. So können z.B. verbrückte Interaktionen zusätzlich berücksichtigt werden. Andererseits ist es ebenso möglich, dass die generierte *Docking*-Lösung energetisch nicht stabil erscheint, der Ligand ein neues Minimum findet und die Simulation schließlich einen neuen Bindungsmodus vorschlägt.

Die folgenden Untersuchungen beschränken sich auf eine Linkerlänge mit 4 Methylengruppen. Dies orientiert sich zum einen an der real in Substanz zur Verfügung stehenden Bibliothek an *Tethering*-Fragmenten (18 Fragmente standen für einen experimentellen Vergleich zur Verfügung), zum anderen soll versucht werden, die Tasche maximal auszuleuchten. Die hohe Flexibilität des Linkers verringert eine mögliche Beeinflussung des Fragments durch die Anbindung selbst und erlaubt viele Freiheitsgrade. Zusätzlich wurden in der Simulation auch solche Fragmente mit einem 4er-Linker getestet, die real in Substanz bisher nur über 2er- oder 3er-Linker verknüpft zur Verfügung stehen (weitere 26 Fragmente). Auf diesem Weg waren zusätzliche Hinweise auf Liganden mit guten Bindeeigenschaften zu erhoffen, die sich synthetisch leicht realisieren lassen sollten. Nach einer erfolgreichen Validierung der Methode wäre somit die Auswahl einer Vielzahl potentieller *Tether*-Liganden und deren anschließende *in silico* Überprüfung hinsichtlich Affinität und Bindungsmodus möglich.

Die Simulation mit AMBER ist gegenüber dem *Docking* eine rechenintensive Methode, die zudem einen hohen Automatisierungsgrad vermissen lässt. Deshalb sollte das Prozedere einfach gehalten werden, um so eine schnelle und qualitativ gute Reproduktion der Ergebnisse gewährleisten zu können. Die Parametrisierung der *Tethering*-Fragmente wurde mittels *antechamber* u.ä. durch Zuteilung von Partialladungen nach der bcc-Methode vorgenommen, wie sie bereits in AMBER implementiert ist. Fehlende Parameter wurden aus dem *generalized amber force field* – *gaff* hinzugefügt. Ebenfalls wurden die Parameter der Disulfidbindung an das Cystein 92 dem *gaff* entnommen. Für die jeweilige Simulation wurde der Rezeptor zusammen mit dem kovalent gebundenen Liganden analog zu den in Kapitel 3.1 beschriebenen Molekulardynamiksimulationen in *tleap* vorbereitet und schließlich nach einer Equilibrierungssequenz die angewendeten *Restraints* graduell gelöst. Die Trajektorie wurde über 20 ns berechnet. Zur visuellen Auswertung wurden 40 Bilder in Abstand von 500 ps mittels *ptraj* extrahiert und auf die Bindetasche der TGT in ihrem Ausgangszustand projiziert (siehe Anhang D). Weiterhin wurden die Geometrien der Liganden über die letzten 10 ns geclustert (je 201 Zustände). Dies erfolgte ebenfalls in *ptraj* mit der Methode *hierarchical* und dem

Tabelle 3.5: Visuelle Auswertung der *Tether*-Beweglichkeit

Bindet in Tasche	Bindet anderer Modus	Bindet nicht
SB096, SB097, SB099, SB109, SB113, SB119, SB120, SB124, SB128, SB231, TK099, TK100, TK101, TK102, TK103, TK104, TK106, TK140, TK141, TK147, TK157, TK164, TK165, TK169, TK170, TK171, TK173, TK174, TK175, TK176	SB102, SB106, SB123, SB127	SB095, SB100, SB101, SB103, SB104, SB107, SB114, SB115, TK098, TK105, TK135
Summe 30 (66.7%)	Summe 4 (8.9%)	Summe 11 (24.4%)

Differenzkriterium von $\epsilon = 1.5$.

Bei einigen wenigen Verbindungen kam es zu einer fehlerhaften Zuweisung von Parametern, sodass die Simulationen keine schlüssigen Ergebnisse lieferten (Az41, Az42, Tz41, Bo333). Diese Liganden wurden im Folgenden nicht weiter berücksichtigt. Diese Fragmente wurden ursprünglich zur Durchführung von *Click*-Reaktionen an Proteinen synthetisiert und unterscheiden sich mithin chemisch deutlich von der für Carboanhydrase II konzipierten Bibliothek. Der chemische Raum der verbliebenen Fragmente ist somit leider eingegrenzt worden.

Zunächst erfolgte die Auswertung mit Hilfe visueller Inspektion der Fragmentbeweglichkeit während der Molekulardynamiksimulation (Anhang D). Dabei wurden die getesteten Liganden in drei Kategorien eingeteilt. Die erste Klasse stellen offensichtlich bindende Fragmente dar, die sich während der Simulation nur wenig innerhalb der zuvor identifizierten Bindetasche bewegen, also eine geringe Abweichung von der ursprünglich vorgeschlagenen *Docking*-Pose zeigen. Die zwei anderen Klassen sind durch deutlich höhere Bewegung des Fragments gekennzeichnet. Allerdings muss zwischen einem diffusen, ungeordneten Bewegungsprofil (Klasse drei) und einer Bewegung hin zu einer neuen Bindungspose mit sich anschließender konstanter Platzierung des *Tether*-Liganden (Klasse zwei) unterschieden werden. Die Zuordnung zu einer dieser beiden Klassen ist nur mit der Methode der Molekulardynamiksimulation möglich und erweitert die Erkenntnisse zum Design potentieller Liganden gegenüber dem *Docking* erheblich. In der ersten Kategorie finden sich etwa zwei Drittel aller Liganden. Dies ist wegen der

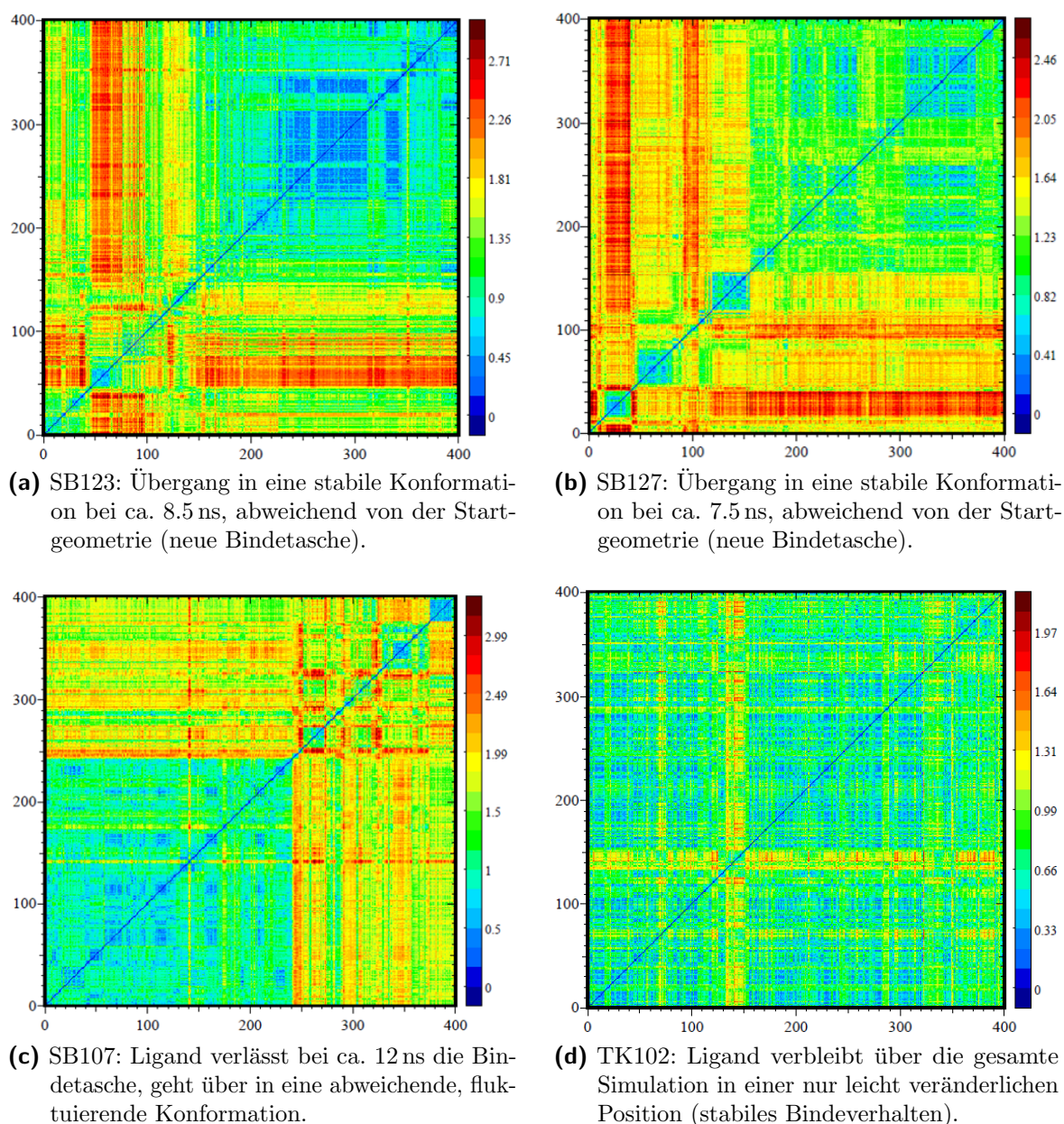


Abbildung 3.44: *2drmsd*-Plots ausgewählter *Tether*-Liganden zur Analyse der Fragmentbeweglichkeit in der MD Simulation. Einheitlich gefärbte Quadrate entlang der Hauptdiagonalen zeigen niedrige Beweglichkeit über einen gewissen Zeitraum (Zeitachse auf der Abszisse und Ordinate in Teilen zu 50 ps, Farbcodierung *rmsd* gegenüber der Startstruktur). Rote Bereiche außerhalb der Hauptdiagonalen weisen auf eine hohe Differenz zwischen einzelnen Clustern hin.

oben diskutierten chemischen Ähnlichkeit der Fragmente nicht verwunderlich. Immerhin ein Viertel der Liganden wird als ungünstig im Rahmen der visuellen Auswertung befunden. Deren strukturelle Unterschiede im Vergleich zu den Fragmenten der Klasse 1 kann das weitere Design inspirieren. Einen völlig neuen Ansatz liefert das Simulationsergebnis für die vier Fragmente in Klasse zwei. Sie besetzen übereinstimmend eine zweite, neue Bindetasche am *Interface* des Proteins, die bisher wegen der geringen Größe als potentielle Bindestelle nicht betrachtet wurde.

Unterstützend kamen zweidimensionale Auftragungen der mittleren quadratischen Abweichung bezogen auf die Startkoordinaten (*2drmsd-Plots*) zum Einsatz. Diese verdeutlichen den visuellen Befund, sind allerdings wegen der unterschiedlichen Skalierung schwerer zu vergleichen. Für SB123 und SB127 zeigen sich darin zum Ende der Simulation stabile Cluster mit großer Abweichung zu den Startkoordinaten (Abbildung 3.44a & 3.44b). Für SB107 ist hingegen gut die anfängliche Stabilität sowie das Verlassen der geordneten Lage in der Bindetasche im zweiten Teil der Simulation abzuleiten (Abbildung 3.44c). Als Beispiel für einen als stabil kategorisierten Liganden kann TK102 mit einer nahezu gleichmäßig gefärbten, auf einen Cluster hindeutenden Fläche angeführt werden (Abbildung 3.44d). Die zusätzlichen Informationen gegenüber der Projektion in Anhang D sind bei der Anwendung des *2drmsd-Plots* jedoch gering: Der zeitliche Verlauf der Beweglichkeit ist zwar gut dargestellt, die Zuordnung gleicher Strukturen in Cluster ist jedoch nur bei eindeutigen Fällen ähnlich zu den genannten Beispielen möglich.

Die visuelle Inspektion und das Hilfsmittel des *2drmsd-Plots* unterliegen wesentlichen Nachteilen: Zunächst sind sie subjektiv durch das Auge des Betrachters gesteuert, ihre Auswertung benötigt bei größerer Anzahl von Fragmenten viel Zeit und ist nicht automatisierbar. Deshalb wurde ein Verfahren angestrebt, das die Beweglichkeit der kovalent gebundenen Fragmente *in silico* bewertet. In Anlehnung an die oben vorgestellte *Docking*-Studie sowie die Flächencluster in den *2drmsd-Plots* wurde dazu ein *Clustering* in Konformationsfamilien genutzt. Die vielen Bilder der Trajektorie werden dabei einer endlichen Anzahl von Zuständen gemäß des Diversitätskriteriums zugeteilt. Eine geringe Clusteranzahl zeigt niedrige Beweglichkeit an. Eine große Anzahl ausgebildeter Clusterzahlen findet man bei zunehmender konformativer Freiheit des Liganden. Da während der Equilibrierungsphase eine *a priori* größere Beweglichkeit auf Grund der Anpassung an das neu angewendete Kraftfelds zu erwarten ist, sollte erst zu einem späteren Zeitpunkt der Simulation das *Clustering* angewendet werden.

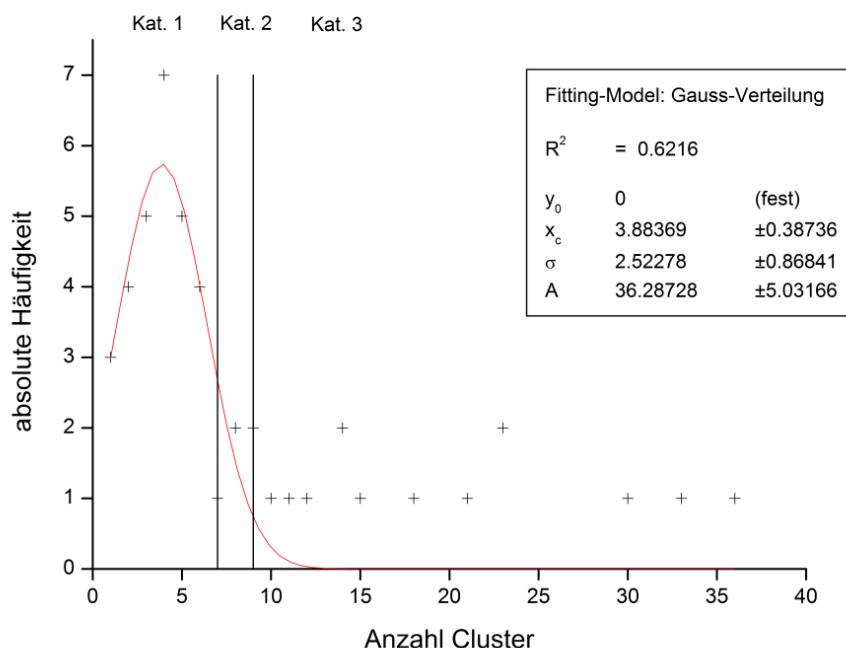


Abbildung 3.45: Statistische Auswertung der Häufigkeit von zugeordneter Clusteranzahl je Fragment. An die aufgetragene Häufigkeit wurde eine Verteilungsfunktion (Gauss'sches Modell) angeglichen, wobei die Verschiebung auf der Ordinate durch einen festen Wert ‚Null‘ verhindert wurde. Entsprechend den Differenzkriterien $x_c + 1\sigma$ und $x_c + 2\sigma$ der Verteilungsfunktion wurden die Fragmente auf Grund der Clusteranzahl in drei Kategorien eingeteilt. Je kleiner die Anzahl zugeordneter Cluster desto stabiler ist die Lage eines Fragments in einer ausgezeichneten Pose.

Da bei der visuellen Inspektion zudem die Bewegung von vier Fragmenten hin zu einer neuen Tasche festgestellt wurde und dieser initiale Taschenwechsel nicht zu einer höheren Anzahl der zu bildenden Cluster führen sollte, wurden lediglich die letzten zehn Nanosekunden der Trajektorie für diese Auswertung herangezogen. Abbildung 3.45 verdeutlicht das Ergebnis für die Trajektorien. Dabei ist zunächst offensichtlich, dass häufig wenige Cluster gefunden werden, selten hingegen eine große Anzahl an Clustern. Im Anhang D ist für jedes Fragment die Clusteranzahl einzeln ausgewiesen. Für diese Verteilung galt es nun ein Kriterium abzuleiten, das aussichtsreich bindende von nichtbindenden Fragmenten diskriminiert. Dazu wurde die Häufigkeitsverteilung der Clusteranzahl in Abbildung 3.45 herangezogen und eine Normalverteilung an die Daten angeglichen, bei $y = 0$ die Basislinie als feste Größe vorgegeben und alle weiteren Parameter frei bestimmt. Das Maximum der Verteilungsfunktion wurde bei

$x_c = 3.88$ erreicht, die Standardabweichung beträgt $\sigma = 2.52$. Da die Clusteranzahl stets ganzzahlig ist, ergibt sich aus den Daten die Maximalstelle bei vier, die einfache Standardabweichung zu drei, die doppelte zu fünf. Da angenommen wird, dass eine geringe Clusteranzahl günstig für das Design eines denkbaren Inhibitors ist, muss folglich lediglich ein Kriterium auf der Seite großer Zahlen, also der maximal tolerierbaren Beweglichkeit, festgelegt werden. Berücksichtigt man, dass sich die bindenden Fragmente durch eine Anzahl von Clustern nahe der Maximalstelle der angeglichenen Normalverteilung wiederfinden, so sollte man ca. sieben Zehntel der zielführenden Fragmente bis zu einer Clusterzahl von sieben und fast alle bis zu einer Clusterzahl von neun finden. Im Folgenden soll deshalb gelten, dass wiederum drei Kategorien der untersuchten Fragmente gebildet werden: Clusteranzahl bis einschließlich sieben – wahrscheinlich bindende Fragmente, Clusteranzahl acht oder neun – visuelle Inspektion notwendig, Clusterzahl größer neun – kaum als sinnvoll zu bewertende Fragmente. Kategorie 1 hat 29 Fragmente (64.4%), Kategorie 2 verfügt über drei Fragmente (6.7%) und Kategorie 3 über dreizehn (28.9%). Die Fragmente der Kategorie 2 wurden visuell zweimal als günstig, einmal als ungünstig ausgewertet, sodass sich in etwa das gleiche Verhältnis zwischen positiven und negativen Fragmenten wie durch ausschließlich optische Begutachtung aller Trajektorien ergibt. Dieser Befund allein gibt jedoch nicht hinreichend Aufschluss über die Qualität der Ergebnisse. Ob der Ansatz eines objektiven Bewertungskriteriums mittels des *Clustering* Erfolg hat, kann insbesondere die Auswertung der Schnittmengen der einzelnen Kategorien in Bezug auf die visuelle Bewertung liefern. Insgesamt wurden 45 Fragmente bewertet, bei denen fünf Abweichungen (entspricht 11%) zu verzeichnen sind. Zwei Fragmente wurden durch das *Clustering* als für das weitere Design wenig aussichtsreich beurteilt, obwohl die visuelle Inspektion eine gute Bindung in der Bindetasche vermuten lässt (SB113, TK141). Weitere zwei Fragmente wurden ebenfalls der Gruppe nichtaussichtsreich zugeordnet, wobei die genaue Betrachtung der Fragmente anzeigt, dass sie die Bindetasche zwar verlassen und jedoch eine Wechselwirkung in der neuen Tasche favorisieren (SB102, SB106). Ein Fragment wurde über das *Clustering* als aussichtsreich bewertet, wohingegen dessen visuelle Inspektion eher ein ungünstiges Bindeverhalten erkennen ließ (SB115). Die Gegenüberstellung der chemischen Eigenschaften aller abweichend klassifizierten Fragmente lässt nicht auf einen systematischen Fehler schließen. Durch Verlängerung der simulierten Trajektorie bzw. der Equilibrierungsphase könnte u.Ü. eine gesicherte Positionierung der in neuer Pose ausgerichteten Fragmente erreicht und damit deren

Bewertung durch das *Clustering* verbessert werden.

Im Vergleich zur Bewertung durch das *Docking* von Felix Terwesten ist der überwiegende Teil der Fragmente gleich bewertet worden. Dabei verfiel die Molekulardynamik aber nicht dem Trend, kleine Fragmente schlechter zu bewerten, sondern berücksichtigte in der Methodik deren Anpassungsfähigkeit an kleine Bindestellen durch größere konformative Freiheiten (z.B. SB106, SB127). Entgegengesetzt zugeordnet wurde TK105, eines der am hochgradigsten funktionalisierten Fragmente, für die ein klassisches *Scoring* eher eine zu gute Bewertung liefert. Innerhalb der Studie erwies sich das Fragment SB107 als problematisch. Dieses wurde mit der gleichen molekularen Struktur ebenfalls als TK173 (Validierungsfragment) eingesetzt. Die beiden Läufe unterschieden sich kaum in der Anfangsgeometrie der Liganden (aus dem *Docking* hervorgegangen), die darüber hinaus im Zuge der Equilibrierungsphase ihre Bedeutung verlieren sollte. Die geringe Differenz der Startstruktur in der Simulation führte folglich dazu, dass der Ligand die Tasche verließ und nicht wieder an die alte Position zurückgelangte. Entweder ist die Bindetasche durch Wasser dann günstiger belegt worden – was ein schlechtes Bindeverhalten unter physiologischen Bedingungen impliziert – oder aber die Simulationsdauer war nicht ausreichend lang, um das relative Energieminimum wieder zu erreichen.

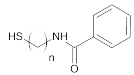
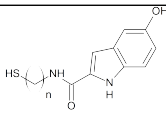
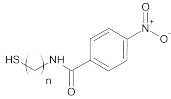
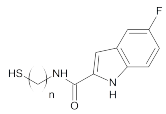
Tethering-Experimente an TGT F92C/C158S/C281S

Parallel zur *in silico* Analyse der *Tethering*-Fragmente wurde deren Bindeverhalten an der mit einem Cystein-Anker ausgestatteten TGT Mutante F92C/C158S/C281S experimentell untersucht. Vorarbeiten durch Johannes Schulze-Wischeler an einer anderen TGT Variante sowie eigene Versuche an der hier näher betrachteten Proteinvariante brachten zunächst wertvolle methodische Erkenntnisse: Das ursprünglich durch Erlanson et al. etablierte Verfahren zur kompetitiven Verwendung mehrerer Liganden in einem Mix zur Reaktion am Cystein-Anker ist an TGT nicht darstellbar. Sowohl unter Nutzung von BME als auch von DTT als Reduktionsmittel kommt es ab dem Einsatz von zwei Fragmenten gleichzeitig (Cocktail) zur Denaturierung des Proteins. Auf welche Ursache dies zurückzuführen ist, blieb dabei unklar; vergleichende Experimente nach demselben Protokoll an Carboanhydrase II durch Johannes Schulze-Wischeler verliefen hingegen zufriedenstellend. Folglich wurde jedes der zur Verfügung stehenden Fragmente einzeln an TGT F92C/C158S/C281S getestet. Wegen der besseren Handhabung und der minderen Giftigkeit wurde DTT als Reduktionsmittel bevorzugt und in der

gleichen Konzentration wie die *Precursor*-Moleküle der Fragmente eingesetzt. Die verfügbare Bibliothek wies in Bezug auf die chemische Zusammensetzung eine Zweiteilung auf: Einige Fragmente (in Tabelle 3.6 mit * markiert) sind lediglich als symmetrische *Precursor*-Moleküle mit zwei Fragmenteinheiten je Molekül verfügbar, alle anderen sind als unsymmetrische Vorläufer verfügbar, bei denen je eine Fragmenteinheit und eine Linkereinheit mit primärer Aminofunktion vorhanden sind. Bei der ersten Variante ist die Konzentration des Fragments also doppelt so hoch wie bei der zweiten Variante. Als vorteilhaft erwies sich jedoch die gesteigerte Löslichkeit der *Precursor*-Moleküle in DMSO bzw. DMSO-Wasser-Gemisch 1:9 durch die Aminogruppe. Bei der massenspektrometrischen Auswertung des mit den symmetrischen Ausgangsverbindungen umgesetzten Proteins sind lediglich Signale für das freie Protein und die Summe aus Fragment und Protein zu erwarten, wohingegen bei der zweiten Variante zusätzlich die Bindung des freien Linkers mit der terminalen Aminogruppe möglich ist. Diese steht dann in Konkurrenz zum eigentlichen Fragmentmolekül und kann das Ergebnis beeinflussen. Eine weitere Heterogenität der Bibliothek ist durch drei unterschiedliche Linkerlängen mit zwei, drei oder vier Methylengruppen zwischen Disulfid- und Amidbindung gegeben. Einige Fragmente stehen in allen drei Gruppen zur Verfügung, andere nur in ein oder zwei Gruppen.

Das Bindeverhalten der Fragmente kann als Ergebnis der massenspektrometrischen Charakterisierung der Reaktionsprodukte (durchgeführt am FB Chemie unter Dr. Uwe Linne) nach einer festen Inkubationszeit von einer Stunde und Abtrennung überschüssigen Precursors als prozentualer Anteil der durch das Fragment belegten Proteinmoleküle angegeben werden. Es wurde eine Versuchsreihe mit einer Konzentrationen der *Precursor*-Moleküle von 200 μ M und 15 μ M TGT durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

Tabelle 3.6: Experimentelle Ergebnisse eines MS *Tethering Screenings* an TGT 92C 158S 281S. Ein * hinter der Fragmentbezeichnung weist auf ein symmetrisches *Tether*-Fragment hin (vgl. Erläuterungen im Text).

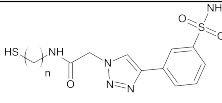
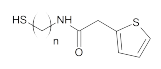
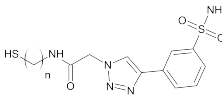
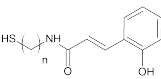
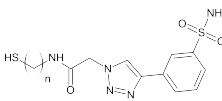
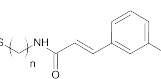
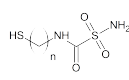
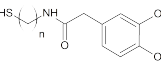

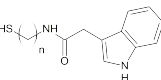
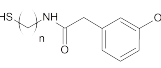
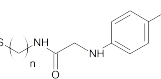
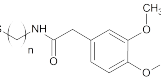
Bez.	Formel	Fragment gebunden	Bez.	Formel	Fragment gebunden
SB095* n=2		17%	TK094 n=3		2%
SB096* n=2		0%	TK095 n=3		6%

3.7 *in silico* unterstütztes, kovalentes Tethering für PPI-Liganden an TGT

Bez.	Formel	Fragment gebunden	Bez.	Formel	Fragment gebunden
SB097* n=2		12%	TK096 n=3		5%
SB099* n=2		17%	TK097 n=3		1%
SB100* n=2		10%	TK098 n=4		1%
SB101* n=2		8%	TK099 n=4		0%
SB102* n=2		18%	TK100 n=4		5%
SB103* n=2		18%	TK101 n=4		9%
SB104* n=2		4%	TK102 n=4		4%
SB106* n=2		9%	TK103 n=4		10%
SB107* n=2		18%	TK104 n=4		5%
SB109* n=2		0%	TK105 n=4		1%
SB113* n=2		8%	TK106 n=4		3%
SB114* n=2		24%	TK107 n=3		2%
SB115* n=2		36%	TK108 n=3		12%
SB119* n=2		6%	TK109 n=3		10%
SB120* n=2		0%	TK110 n=2		3%

3 Ergebnisse und Diskussion

Bez.	Formel	Fragment gebunden	Bez.	Formel	Fragment gebunden
SB123* n=2		0%	TK111 n=2		3%
SB124* n=2		15%	TK112 n=2		2%
SB127* n=2		14%	TK135 n=3		3%
SB128* n=2		5%	TK136 n=2		5%
SB226 n=2		–%	TK140 n=2		3%
SB227 n=2		–%	TK141 n=2		8%
SB228 n=2		–%	TK142 n=2		5%
SB229 n=2		8%	TK147 n=2		4%
SB231 n=2		–%	TK148 n=3		10%
SB232 n=2		9%	TK149 n=3		2%
SB233 n=2		9%	TK150 n=3		4%
AZ21* n=2		6%	TK157 n=3		1%
AZ22* n=2		11%	TK158 n=3		5%
AZ31* n=3		7%	TK162 n=3		5%
			TK163 n=3		6%
			TK164 n=4		1%

Bez.	Formel	Fragment gebunden	Bez.	Formel	Fragment gebunden
TZ21* n=2		14%	TK165 n=4		3%
TZ31* n=3		5%	TK169 n=4		8%
TZ41* n=4		1%	TK170 n=4		10%
BO333* n=2		4%	TK171 n=4		3%
CysA n=2		28%	TK173 n=4		0%
			TK174 n=4		6%
			TK175 n=4		4%
			TK176 n=4		1%

Insgesamt ist die Affinität der untersuchten Fragmente bei der gewählten Konzentration als gering einzuschätzen. Der beste Ligand bindet lediglich an 36% des zur Verfügung stehenden Proteins. Nur neun der untersuchten Fragmente binden an mehr als 15% (Gruppe 1), 34 Fragmente binden an weniger als 10% (Gruppe 3) des Proteins. Dieses relativ homogene Ergebnis spiegelt die chemische Ähnlichkeit der Bibliotheksmitglieder wider. Bis auf CysA sind alle Vertreter der Gruppe 1 symmetrische Verbindungen, d.h. deren effektive Konzentration an umsetzbarem Fragment liegt beim doppelten Wert, also 400 μ M. Allerdings scheint dies keine prinzipiell überproportionale Bindeaffinität zu verursachen, da andere symmetrische *Precursor*-Moleküle auch der Gruppe 3 angehören bzw. CysA mit der Nennkonzentration ebenfalls zu 28% an TGT bindet. Aus der Gruppe 1 stechen mit SB114 (24%), SB115 (36%) und CysA (28%) drei Fragmente in ihrem Bindeverhalten hervor. Ihre chemische Struktur ist nicht durch ein einheitliches Motiv geprägt (CysA besitzt nahezu keinen räumlichen Anspruch, SB115 mit Naphtylgruppe ist hingegen sterisch deutlich anspruchsvoller). Auch liegt in der chemischen Abgrenzung zum Rest der untersuchten Moleküle keine Erklärung für den signifikanten Unterschied in der Affinität. Andere z.T. sehr ähnliche Fragmente binden mit deutlich niedrigerem

prozentualen Anteil an das Protein (SB115 ähnlich zu TK107 & TK098 – 1 bzw. 2% gebunden, SB114 ähnlich zu TK110 – 3% gebunden). Gleiche Fragmente mit differierenden Linkerlängen binden nicht zum gleichen Prozentsatz, vielmehr scheint sich die Affinität ohne einheitlichen Trend zu verändern (proportional bei TK111–TK095–TK101, antiproportional bei TZ21–TZ31–TZ41, nahezu konstant bei TK112–TK094–TK100). Die Gesamtheit der Ergebnisse lässt den Schluss zu, dass die zur Verfügung stehende Fragmentbibliothek nicht zur Bindung an TGT im fokussierten Bereich geeignet ist. Andererseits sollten sich klare, positive Trends aus dem Bindeverhalten ableiten lassen können.

Die beobachtete Affinität kann mit erhöhter Konzentration u.Ü. dazu genutzt werden, die Bindestelle strukturell zu charakterisieren. In entsprechenden Experimenten konnte zwar eine vollständige Sättigung des Cystein-Ankers erreicht werden (Nachweis erfolgte für TK100 sowie CysA über denaturierende Massenspektrometrie), die anschließende Röntgenstrukturanalyse des kristallisierten Proteins zeigte jedoch keine Elektronendichte für den Liganden und keine sonstigen strukturellen Unterschiede zur eingesetzten Variante TGT F92C/C158S/C281S. Es scheint entweder ein geringer Restbestand des freien Proteins kristallisiert zu sein oder unter den Kristallisationsbedingungen ist die kovalente Disulfidbindung zwischen Cystein und Fragment gespalten worden. Die Strukturaufklärung wurde deshalb zunächst nicht weiter verfolgt.

3.8 Diskussion III: A long way ,reaching for high-hanging fruit' [1]

Die Fokussierung hin zu einem Startpunkt für das strukturbasierte Wirkstoffdesign eines *Interface*-Inhibitors an TGT muss zunächst hinterfragt werden. Die gewählte Methodik wies zum entsprechenden Projektzeitpunkt nicht einkalkulierbare, jedoch im Nachgang betrachtet entscheidende Nachteile auf: Das *Docking* und die sich anschließende Molekulardynamiksimulation der vorhandenen Fragmentbibliothek orientierten sich an einer Rezeptorstruktur, die nach neueren Erkenntnissen nicht der tatsächlich in Lösung vorliegenden Konformation entspricht. Vielmehr ist es als wahrscheinlich anzusehen, dass sich die strukturell entscheidende Region in einer abweichenden Konformation befindet (die durch das *solvent mapping* nicht nachgestellt werden konnte) und somit die *in silico* abgeleiteten Aussagen über das Bindeverhalten nicht auf die experimentell beobachtete Affinität übertragen werden können. Ein Vergleich der Bewertung der

Fragmentaffinität durch beide Methoden ist deshalb nicht statthaft.

Im experimentellen *Tether-Screening* zeigte sich zudem, dass die vorhandene Fragmentbibliothek in ihrer chemischen Charakteristik nicht auf den speziellen Rezeptor zugeschnitten ist und keine überragenden *Hits* gefunden bzw. verifiziert werden konnten. Zum einen wurden chemisch ähnliche Substanzen unterschiedlich stark gebunden. Andererseits zeigten die Mitglieder aus der Gruppe der besten Treffer keine strukturelle Einheitlichkeit. Zusätzlich lagen ihre Bindungsanteile relativ niedrig. Methodisch konnte gezeigt werden, dass die Länge des Linkers zum Cystein-Anker nicht zu einer systematischen Verschiebung der beobachteten Bindungsanteile führt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit an einem *Interface*-Liganden für TGT sollte u.Ü. das neu eingeführte Cys330 genutzt werden, um so, mit einem *Tether*-Fragment gesättigt, in wahrscheinlich wiederum neuer Kristallpackung kristallisiert zu werden. Die Cys330-Cys330'-Bindung wird so blockiert und das Monomer freigesetzt. So könnten neue Strukturinformationen erschlossen und der Bereich um den Loopflip bei 46-52 nochmals unter geänderten Bedingungen charakterisiert werden. Im günstigsten Fall kann sogar ein erster Hinweis auf eine Protein-Fragment-Bindung mittels der Röntgenstrukturanalyse gewonnen werden.

Der Einsatz der Molekulardynamik für die Fragmentbewertung eines virtuellen *Tetherings* konnte trotz der Übertragbarkeitsdefizite einige bemerkenswerte Besonderheiten demonstrieren. Dabei steht die Frage im Mittelpunkt, wie die Flexibilität, d.h. die Anpassungsfähigkeit des Rezeptors auf den Liganden sowie anders herum, berücksichtigt werden kann. Dies ist zwar kein ausschließlich auf Protein-Protein-Interaktionen beschränktes Problem, hat aber bei dem hier untersuchten Enzym durchaus vorrangige Relevanz (vergleiche dazu auch González-Ruiz und Gohlke ^[122] sowie Alonso et al. ^[133]). So stellt sich das *Interface* meist als weite Bindungsregion dar, die im Gegensatz zur räumlich engen Ausrichtung in einer definierten Bindetasche dem Ligand zahlreiche Möglichkeiten zum Einnehmen unterschiedlicher Bindungsposen lässt. Zwar ist durch den *Tether*-Anker zunächst ein Fixpunkt festgelegt, der von dort ausgehende Richtungsvektor ist jedoch noch in viele Richtungen orientierbar. Diese Multiplizität kann eine kraftfeldbasierte Simulationsmethode wie die Molekulardynamik sehr gut nachstellen, da sie alle Freiheitsgrade des Moleküls entsprechend zulässt. Dabei sind sowohl die Beweglichkeiten der Liganden, des Rezeptors als auch der vorhandenen Lösemittelmoleküle zu berücksichtigen. Die gegenseitige Beeinflussung kann sich dabei als *induced fit effect* auswirken und Bindemodi aufzeigen, die ohne das Zusammenwir-

ken aller Komponenten nicht gefunden worden wären. Zuvor abgeleitete differierende Rezeptorkonformationen, einfache Seitenkettenrotationen oder das An- und Abschalten von Wassermolekülen würden nicht diese Ergebnisse erzielen.^[133] Obwohl mit dem Grad der Detailtiefe und der Summe berücksichtigter Freiheitsgrade der Rechenaufwand enorm steigt, ist der Vorteil im Berücksichtigen multipler Konformationen für das Ligandendesign hoch. Denn im Gegensatz zum klassischen *Docking* findet keine alleinige Bewertung von Liganden hinsichtlich der Affinität in einer vorgegebenen und sich strukturell nicht anpassenden Tasche statt, sondern es werden vielmehr zusätzliche Möglichkeiten des Ligandwachstums und der induzierten Anpassung entlang der Proteinoberfläche ausgekundschaftet.

Am Beispiel der TGT konnte dieser Vorteil entsprechend mit gleich vier Fragmenten gezeigt werden. Dabei besetzen die Fragmente eine kleine Tasche, die zuvor mit drei Wassermolekülen besetzt war. Während das 4-Nitrobenzylfragment SB102, das größte Fragment in dieser Gruppe, bis zum Ende der Simulation lediglich in die geänderte Richtung auf der Proteinoberfläche weist und die beginnende Anpassung der Rezeptor-Ligand-Orientierung noch nicht vollständig abgeschlossen erscheint, ragen die anderen drei Fragmente SB106, SB127 und SB123 bereits in die Tasche hinein. Je nach sterischem Anspruch des Liganden ändert sich dabei auch die Taschengröße. Das Spektrum der Fragmentsubstituenten reicht von Trifluormethyl (SB106) über Isobutyl (SB127) bis zu Hexyl (SB123). Diese drei Fragmente sind nicht in der Lage, gerichtete Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, wären also auch bei einer Bewertung über viele *Scoring*-Funktionen eher benachteiligt. Der so gezeigte Ansatz fand bisher vielfach Anwendung und wurde durch Alonso et al. in einem Review ausführlich dargestellt.^[133] Einige Gruppen konnten z.B. mit dem MMPBSA-Ansatz entsprechende Bindungsenergien in guter Übereinstimmung zu experimentellen Werten berechnen sowie auf diese Weise strukturelle Voraussagen in sehr guter Näherung an kristallographische Befunde erlangen. Einen vergleichbaren Fall zum hier betrachteten *Tethering* an TGT zeigten Tóth et al. mit ausgewählten Fragmenten an IL-2 bzw. IL-4.^[134] Sie stellten fest, dass der *induced fit* über eine Kombination aus Minimierung, *Clustering* und Molekulardynamiksimulation (bezeichnet als SCI&FI - *Systematic Conformational Search & Induced Fit*) am besten zu behandeln ist, wenn der Ligand über einen *Tether* an das Protein gebunden ist.

Aus den genannten Vorteilen lässt sich die Annahme ableiten, dass der *Tethering*-Ansatz in einer *in silico* Implementierung ein zukunftsfähiges Instrument für das

Virtual Screening darstellt. Die Vorbereitung einer umfangreichen Bibliothek aus Fragmentmolekülen lässt sich leicht automatisieren, der Austausch gebundener Gruppen, die Kombination mit verschiedenen Linkerlängen sowie die einfach umzusetzende *in silico* Mutation des Cystein-Ankers erlauben einen breiten chemischen Suchraum und die flexible Anpassung auf das zu bearbeitende Zielprotein. Eine einfache Umsetzung des *Extended-Tethering* ^[123] ist zudem möglich, bei dem die *Tether*-Fragmente mit funktionellen Gruppen ausgestattet werden, die selbst für ein zweites *Tethering* als Ankerpunkt dienen können. Die Bewertung über ein *Clustering* der konformativen Zustände des Liganden über den Zeitraum der Simulation ist eine Standardmethode. Insbesondere im Gegensatz zur aufwändigen gentechnischen Mutation des Enzyms ist ein besonderer Zeit- und Kostenvorteil zu sehen. Nichtsdestotrotz bleibt jede Technik, die Molekulardynamik nutzt, computerseitig sehr anspruchsvoll. Optimierte Programm-codes und neue Entwicklungen im Bereich des GPU-*Computings* bedingen jedoch eine zunehmende Reduzierung der Laufzeiten solcher Simulationen. Berücksichtigt man, dass die Anfänge des fragmentbasierten Wirkstoffdesigns gerade zwei Jahrzehnte zurückliegen ^[17], ist das Potential der Methode offensichtlich.

4 Zusammenschau und Ausblick

Die hier vorgestellte Arbeit verfolgte mehrere Ziele. Zunächst wurde auf methodischer Ebene die Arbeit an Protein-Protein-*Interfaces* hinsichtlich des computerunterstützten strukturbasierten Wirkstoffdesigns in Angriff genommen. Die Basis dafür bildete das in der Arbeitsgruppe etablierte Zielenzym tRNA-Guanin Transglycosylase aus *Zymomonas mobilis*. Zu Beginn der Arbeit konnte auf die hochaufgelöste Proteinstruktur des Homodimers, Kenntnisse der enzymatischen Funktion sowie einen umfangreichen Erfahrungsschatz hinsichtlich der Charakterisierung des *apo*-Proteins zurückgegriffen werden. Erste Hinweise auf strukturelle Änderungen bei zielgerichteter Mutation im *Interface*-Bereich bildeten die Motivation für eine umfassende Betrachtung der vorliegenden Bindungsverhältnisse im Protein-Protein-Kontakt sowie die Störung des enzymatisch aktiven Dimers mit Ausbildung der inaktiven monomeren Form auch auf experimenteller Ebene.

Ausgehend von einer intensiven Charakterisierung des TGT Dimers unter Zuhilfenahme von statistischer Analyse der Wasserstoffbrücken in allen TGT Strukturen aus der RCSB-Proteindatenbank (PDB), sowie verschiedener Molekulardynamiksimulationen des Wildtyps und ausgewählter, *in silico* mutierter Enzymvarianten wurden die *Hot-Spots* der Protein-Protein-Interaktion abgeschätzt und die Variante TGT W326E/E339Q zur experimentellen Validierung ausgewählt.

Nach erfolgter Mutagenese und Produktion des Proteins in *E.coli* wurde der Oligomerisierungsgrad via nativer Massenspektrometrie als Monomer bestimmt und daraufhin eine vollständige Charakterisierung aus struktureller und funktioneller Sicht durchgeführt. Dabei trat eine verminderte enzymatische Aktivität auf, mit der bei einer Dissoziation unter Bildung eines hohen Anteils an Monomer gerechnet werden durfte. Die Kristallstruktur des Proteins zeigte sich in gewohnter Symmetrie hinsichtlich der Packung im Kristall, sodass die Ausbildung eines kristallographischen Dimers, das dem funktionalen Dimer des Wildtyps entspricht, gefunden wurde. Abweichungen in der Struktur ergaben sich im Interfacebereich in einem Loop, der von den Aminosäuren 46

bis 52 gebildet wird.

Die Ausprägung der konformativen Änderung in Zusammenhang mit der zuvor durchgeführten *Hot-Spot*-Analyse deuteten auf ein für die Stabilisierung des Dimers entscheidendes Strukturmotiv hin: einen Cluster aromatischer Aminosäuren. Darin bilden die Aminosäuren Trp326, Tyr330, Phe92' und His333, durch π -*Stacking* miteinander verbunden, ein Netzwerk über die zwei Polypeptidketten aus, das wiederum ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen unterstützt. Durch die C2-Symmetrie ist dieses Cluster je Enzymkomplex zweifach ausgebildet.

Im Folgenden wurde dieses Netzwerk durch die Mutationen F92C sowie Y330C aufgebrochen und die Wirkung hinsichtlich der Monomerisierung geprüft. In allen Fällen konnte ein überwiegender Monomeranteil festgestellt werden. Die Strukturaufklärung ergab für TGT F92C/C158S/C281S die gleichen Befunde wie für TGT C158S/C281S/W326E/E339Q. Bei TGT Y330C kam es spontan zur kovalenten Dimerisierung durch Ausbildung einer Disulfidbrücke Cys330–Cys330', sobald Kristalle unter bestimmten Bedingungen gezüchtet wurden. Dies führte zu einer geänderten Orientierung der Monomere untereinander, damit zu einer neuartigen Anordnung im Kristall und Ausbildung der Kristalle in der für TGT bisher nicht beobachteten Raumgruppe P6₅22. Unter anderen Kristallisationsbedingungen wurde hingegen die Struktur des Wildtyps in der regulären Raumgruppe C2 gefunden.

Zwar ist damit noch nicht abschließend die letztgültige Strukturaufklärung des TGT Monomers erreicht, jedoch in der Raumgruppe P6₅22 lässt die Anordnung der Moleküle eine weitgehende konformative Freiheit im eigentlichen *Interface*-Bereich zu. Trotzdem kommt es wiederum nur zu einer Umorientierung des Loops 46 bis 52 - interessanterweise in einer zuvor nicht beobachteten Konformation. Diese neue Anordnung ist zudem mit der Ausbildung des C₂-symmetrischen Dimerinterface nicht kompatibel. Daher wäre mit einer Stabilisierung dieser Konformation durch einen Liganden in der Lage die Bildung des funktionalen Dimers zu vereiteln. Die Bestimmung der monomeren Struktur bleibt eine noch zu lösende Aufgabe. Für die Generierung des Monomers kann nun zusätzlich die Aminosäure Cys330 genutzt werden, indem hier die Dimerisierung störende Liganden analog zum *Tethering* kovalent gebunden werden. Ebenfalls bleibt der Beitrag von His333 experimentell zu erschließen.

Eine erste Untersuchung hinsichtlich eines PPI-Liganden mittels kovalenten Fragment-*Screenings* (*Tetherings*) fußte auf Erkenntnissen über die Enzymvariante TGT F92C/C158S/C281S. Mögliche *Docking*-Posen in einer durch die konformative Än-

derung des Loopbereichs 46 bis 52 frei gewordene Tasche wurden in dieser Arbeit mittel Molekulardynamik-Simulationen näher analysiert. Zur Bewertung wurde eine statistische Auswertung des *Clusterings* der Bewegungsprofile herangezogen. Die vorgenommene Klassifizierung ermöglichte nicht nur die Trennung von potentiell bindenden und nicht-bindenden Liganden; zusätzlich konnte die mögliche Relevanz einer weiteren Subtasche der Startstruktur aufgeklärt werden.

Eine anschließende Validierung der *in silico* gewonnenen Erkenntnisse mittels MS gekoppelten *Tetherings* einer verfügbaren Fragment-Bibliothek von ca. 50 Liganden an TGT F92C/C158S/C281S zeigte, dass die in Lösung vorliegende Faltung des Loops vermutlich nicht mit der für die *in silico* Berechnungen genutzten Startstruktur übereinstimmt. Das experimentell beobachtete Affinitätsprofil der *Tether*-Fragmente deckt sich nicht mit den Rechenergebnissen, die betrachtete Tasche ist mithin höchstwahrscheinlich nicht in der Gestalt ausgeprägt, wie zunächst angenommen. Viele Mitglieder der Bibliothek erscheinen demnach auch nicht zur Bindung im untersuchten Bereich des TGT-*Interface* geeignet. Für einige wenige Fragmente konnte allerdings massenspektrometrisch ein signifikanter Anteil hinsichtlich der kovalenten Verknüpfung an Cys92 nachgewiesen werden. Eine Proteinstrukturbestimmung mit gebundenem *Tether* war auf Grund ausbleibender Kristallisation nicht möglich.

Für die Adressierung des Protein-Protein-*Interface* der TGT mit einem potenten Ligandmolekül bleiben so noch einige Aufgaben offen. Über ein neues *Screening* an Cys330 und die intensive Suche nach Bedingungen für ein genügendes Kristallwachstum können beide Stränge dieser Arbeit zusammengeführt werden. Die Nutzung der gezeigten Methodik zur *in silico* Bewertung der kovalent gebundenen Liganden lässt sich dabei erneut anwenden. Der chemische Raum der Fragmentbibliothek sollte dazu zielgerichtet erweitert werden. Bis schließlich ein PPI-Ligand an TGT zur Verfügung stehen wird, sind noch zahlreiche Anstrengungen zu unternehmen. In dieser Arbeit konnten die entscheidenden Bindeverhältnisse am *Interface* vorhergesagt sowie verifiziert werden. Weiterhin wurden methodische Vorarbeiten zur Ligamentwicklung geleistet und Ideen für die nächsten Schritte hin zur '*high-hanging fruit*' eines nicht kompetitiv wirkenden Protein-Protein-*Interface*-Antagonisten an tRNA-Guanine Transglycosylase entwickelt.

A Nukleotidsequenz des TGT Wildtyp ZM10

Die abgedruckte Sequenz codiert für den Wildtyp der tRNA-Guianin Transglycosylase und wurde in 2010 aus der Peptidsequenz mit optimierten Codons für die Expression in *E.coli* durch die Firma GENEART, Regensburg, abgeleitet. Die Vorsequenz beinhaltet das Start-Codon, einen Linker (2 AS), den Streptag (8 AS), den Kinker (6 AS) und die Thrombin-Schnittstelle (6 AS). Nach dem Thrombin-Schnitt verbleiben die letzten zwei Aminosäuren Gly und Ser am Zielprotein.

```
001*  ATGGCTAGCTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAATCTGGTGGTGGTGGTGGTCTGGTTCCG
001*  M  A  S  W  S  H  P  Q  F  E  K  S  G  G  G  G  G  L  V  P
```

```
061*  CGTGGCTCC
021*  R  G  S
```

```
0001  ATGGTTGAAGCAACCGCACAGAAGAAACCGATCGTCCGCGTTTTAGCTTTAGCATTGCAGCA
0001  M  V  E  A  T  A  Q  E  T  D  R  P  R  F  S  F  S  I  A  A
```

```
0061  CGTGAAGGTAAAGCACGTACCGGCACCATTGAAATGAAACGTGGTGTATTTCGTACCCCT
0021  R  E  G  K  A  R  T  G  T  I  E  M  K  R  G  V  I  R  T  P
```

```
0121  GCATTTATGCCGTTGGCACCGCAGCAACCGTTAAAGCACTGAAACCGGAAACCGTTCGT
0041  A  F  M  P  V  G  T  A  A  T  V  K  A  L  K  P  E  T  V  R
```

```
0181  GCAACCGGTGCAGATATTATTCTGGGTAATACCTATCATCTGATGCTGCGTCCGGGTGCA
0061  A  T  G  A  D  I  I  L  G  N  T  Y  H  L  M  L  R  P  G  A
```

0241 GAACGTATTGCAAAACTGGGTGGTCTGCATAGCTTTATGGGTGGGATCGTCCGATTCTG
0081 E R I A K L G G L H S F M G W D R P I L

0301 ACCGATAGCGGTGGTTATCAGGTTATGAGCCTGAGCAGCCTGACCAAACAGAGCGAAGAA
0101 T D S G G Y Q V M S L S S L T K Q S E E

0361 GGTGTTACCTTTAAAGCCATCTGGATGGTAGCCGTCATATGCTGAGTCCGGAACGTAGC
0121 G V T F K S H L D G S R H M L S P E R S

0421 ATTGAAATTCAGCATCTGCTGGGTAGCGATATTGTTATGGCATTGTGATGAATGTACCCCG
0141 I E I Q H L L G S D I V M A F D E C T P

0481 TATCCGGCAACCCCGAGCCGTGCAGCAAGCAGCATGGAACGTAGTATGCGTTGGGCAAAA
0161 Y P A T P S R A A S S M E R S M R W A K

0541 CGTAGCCGTGATGCATTTGATAGCCGTAAAGAACAGGCAGAAAAATGCAGCACTGTTTGGT
0181 R S R D A F D S R K E Q A E N A A L F G

0601 ATTCAGCAGGGTAGCGTTTTTGAATCTGCGTCAGCAGAGCGCAGATGCACTGGCAGAA
0201 I Q Q G S V F E N L R Q Q S A D A L A E

0661 ATTGGTTTTGATGGTTATGCAGTTGGTGGTCTGGCAGTTGGTGAAGGTCAGGATGAAATG
0221 I G F D G Y A V G G L A V G E G Q D E M

0721 TTTCGTGTTCTGGATTTTAGCGTTCCGATGCTGCCGGATGATAAACCGCATTATCTGATG
0241 F R V L D F S V P M L P D D K P H Y L M

0781 GGTGTTGGTAAACCGGATGATATTGTTGGTGCAGTTGAACGTGGCATCGATATGTTTGAT
0261 G V G K P D D I V G A V E R G I D M F D

0841 TGTGTTCTGCCGACCCGTAGCGGTCGTAATGGTCAGGCATTTACCTGGGATGGTCCGATT
0281 C V L P T R S G R N G Q A F T W D G P I

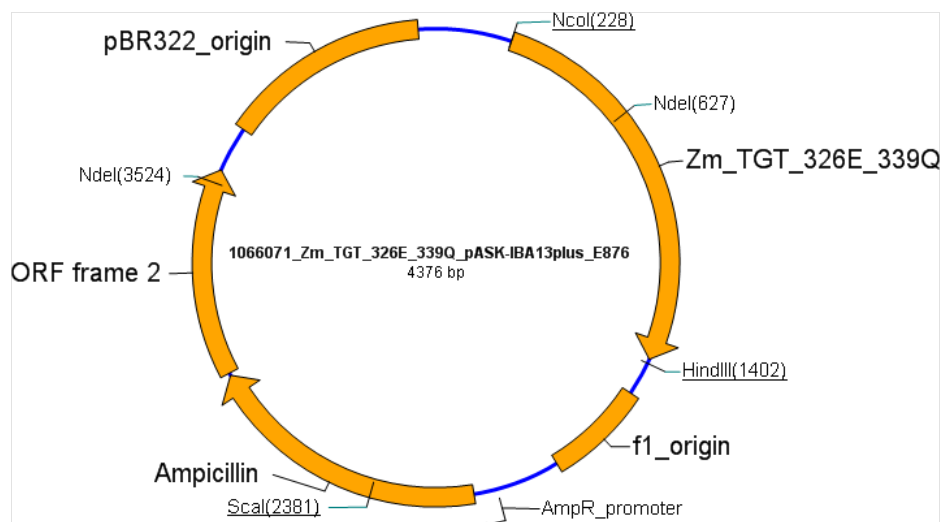
0901 AACATTCGTAATGCACGTTTTAGCGAGGATCTGAAACCGCTGGATAGCGAATGTCATTGT
0301 N I R N A R F S E D L K P L D S E C H C

0961 GCAGTTTGT CAGAAATGGAGCCGTGCCTATATTCATCATCTGATTCTGTCAGGTGAGATT
0321 A V C Q K W S R A Y I H H L I R A G Q I

1021 CTGGGTGCAATGCTGATGACCGAACATAATATTGCCTTTTATCAGCAGCTGATGCAGAAA
0341 L G A M L M T E H N I A F Y Q Q L M Q K

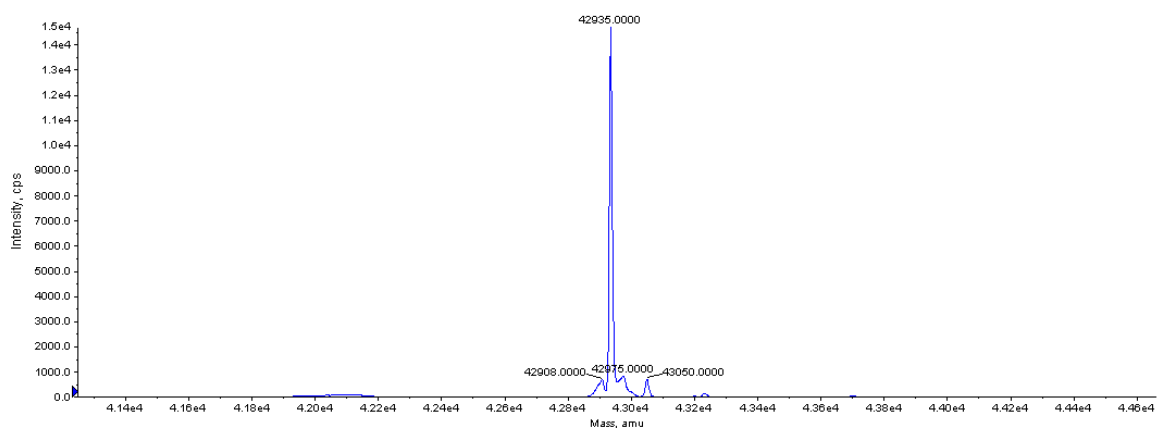
1081 ATTCGCGATAGCATTAGCGAAGGTCGTTTTAGCCAGTTTGCACAGGATTTTCGTGCACGT
0361 I R D S I S E G R F S Q F A Q D F R A R

1121 TATTTTGCACGCAACAGCTAA
0381 Y F A R N S *stop*

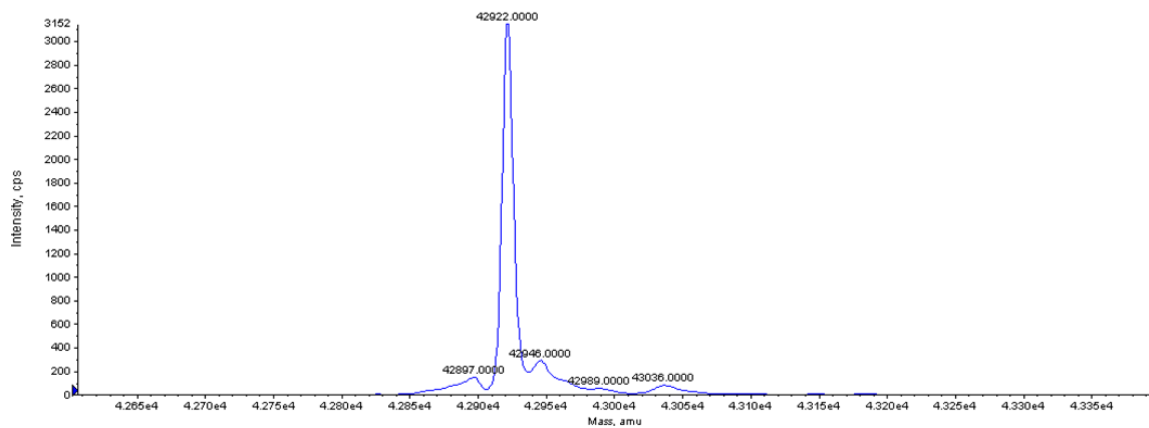


Plasmid-Karte für ZM10 in pASK-IBA13plus. Quelle: Fa. Geneart.

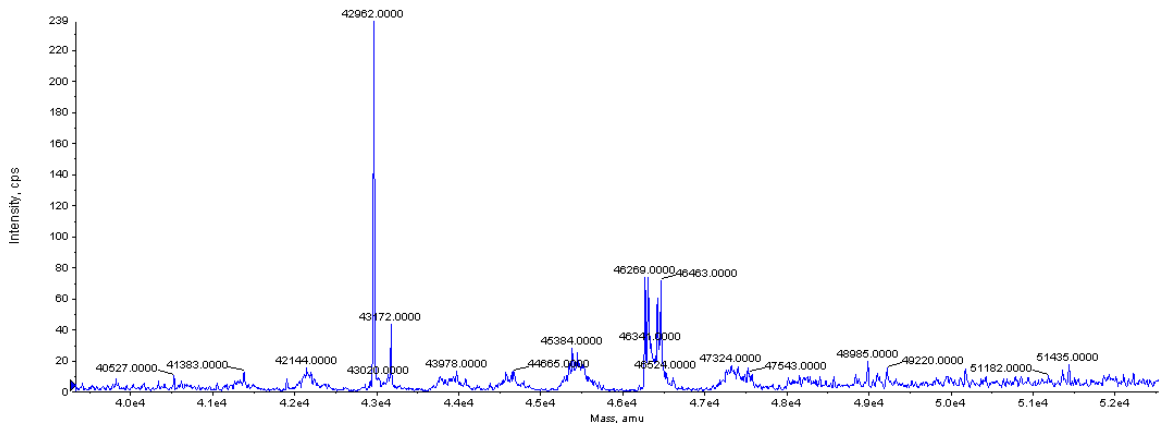
B Massenspektren exprimierter TGT Varianten



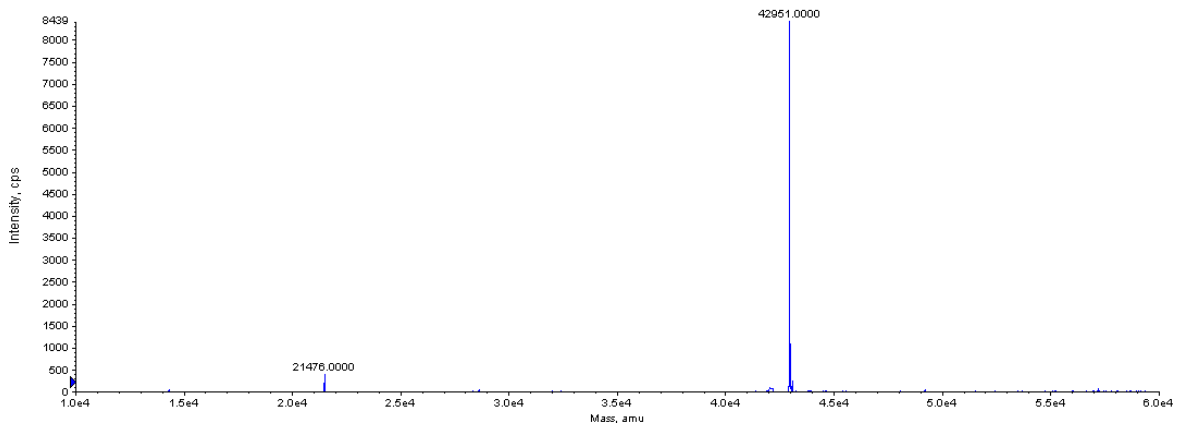
TGT F92C/C158S/C281S, Theoretische Masse 42 937.6 Da inkl. Gly und Ser von Strep-Tag



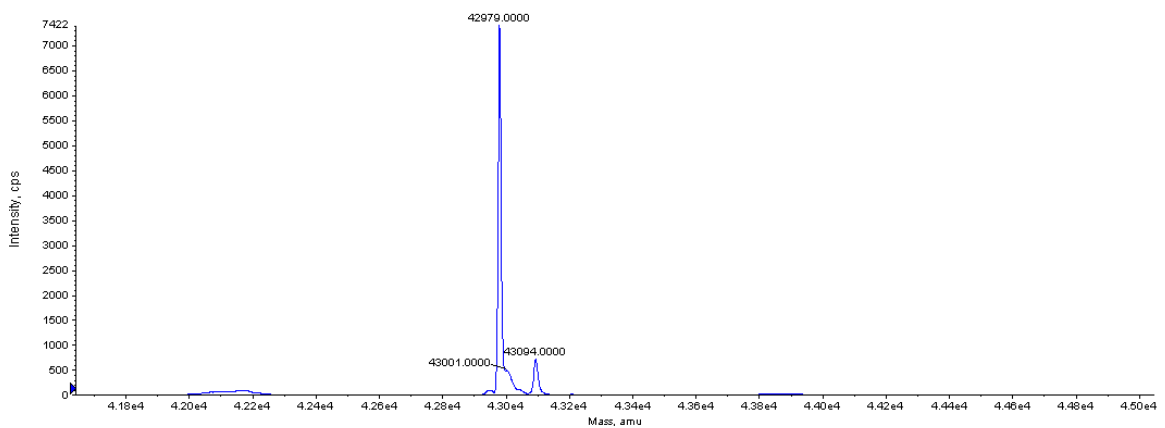
TGT C158S/C281S/W326E/E339Q, Theoretische Masse 42 923.6 Da inkl. Gly und Ser von Strep-Tag



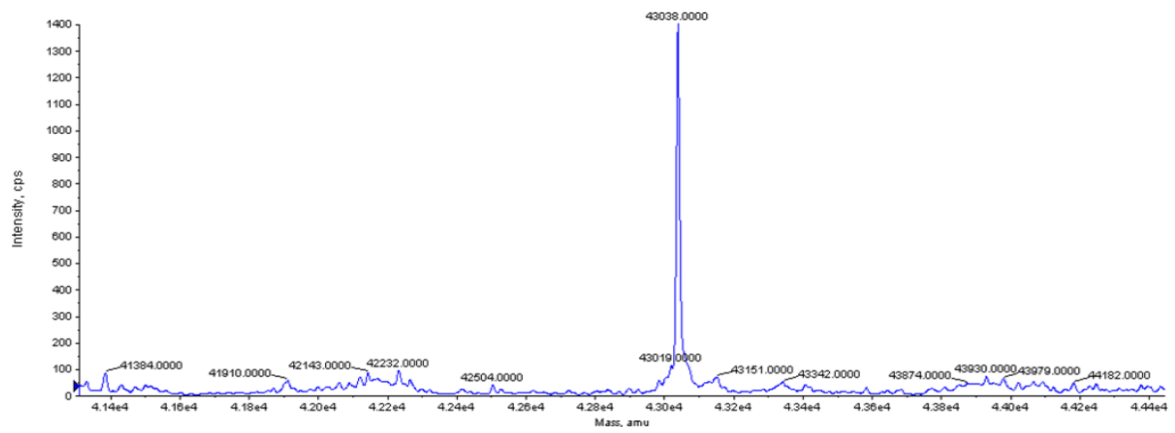
TGT Y330I, Theoretische Masse 42 963.8 Da inkl. Gly und Ser von Strep-Tag



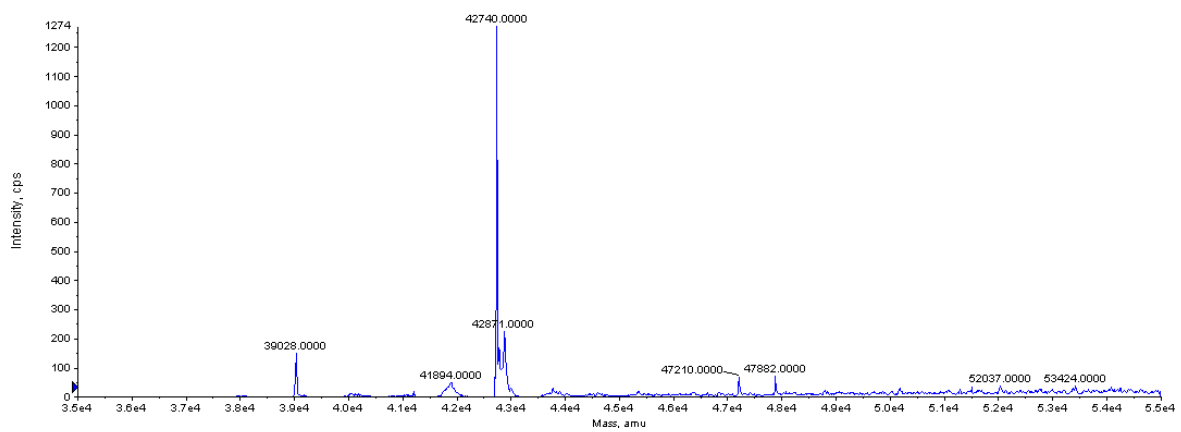
TGT Y330C, Theoretische Masse 42 953.7 Da inkl. Gly und Ser von Strep-Tag



TGT Y330D, Theoretische Masse 42 965.7 Da inkl. Gly und Ser von Strep-Tag



TGT E339Q, Theoretische Masse 43 012.8 Da, inkl. Gly und Ser von Strep-Tag, mögliches Addukt Na^+



TGT K52M, Theoretische Masse 42 741.5 Da, Expression ohne Strep-Tag am Beginn der Sequenz

C Kristallographische Tabellen

	TGT K52M	TGT E339Q	TGT F92C/C158S/C281S
pdb-Code	4DXX	3UNT	4DY1
Datensammlung			
Beamline	BESSY 14.2	BESSY 14.2	BESSY 14.2
Wellenlänge	0.918 41 Å	0.918 41 Å	0.918 41 Å
Raumgruppe	C121	C121	C121
Zelle			
a	91.2	91.3	90.8
b	64.9	64.9	64.6
c	70.1	70.2	71.1
α	90.0	90.0	90.0
β	96.0	96.0	96.4
γ	90.0	90.0	90.0
Diffraktionsdaten			
Auflösungsbereich	50.0 - 1.66 (1.69 - 1.66)	30.0 - 1.80 (1.83 - 1.80)	50.0 - 2.04 (2.09 - 2.04)
Anzahl der Reflexe	47912(2330)	36234 (1618)	25405(1085)
R(I) _{sym}	0.049 (0.285)	0.089 (0.283)	0.100 (0.375)
Vollständigkeit	99.6% (96.6%)	95.7% (87.5%)	97.9% (84.4%)
Redundanz	2.6 (2.5)	2.7 (2.0)	3.6 (2.3)
I/ σ (I)	18.1 (3.8)	10.9 (2.8)	11.6 (2.2)
Verfeinerung			
Auflösungsbereich	34.9 - 1.66 (1.69 - 1.66)	18.9 - 1.80 (1.85-1.80)	25.2 - 2.04 (2.13 - 2.04)
Anzahl der Reflexe	47886 (2768)	36210 (2421)	23698 (2118)
R-Werte:			
R _{free}	0.1990 (0.2521)	0.1847 (0.2456)	0.2200 (0.2710)
R _{work}	0.1658 (0.2249)	0.1536 (0.2034)	0.1660 (0.2009)
Nicht-Wasserstoff-Atome:			
Protein	2989	2899	2916
Wasser	421	399	362
sonstige Liganden		23	3
Abweichungen von idealer Geometrie (rmsd):			
Winkel	1.084	1.036	1.053
Bindungen	0.006	0.007	0.007
Ramachandram (Procheck ^[135]):			
favorisiert	95.3%	95.0%	95.8%
erlaubt	4.4%	4.7%	3.5%
toleriert	0.3%	0.3%	0.6%
verboten	0.0%	0.0%	0.0%
mittlere B-Werte:			
Protein	15.62	15.66	21.25
Wasser	28.55	27.57	30.38

Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

	TGT 330C	TGT 330C	TGT C158S/ C281S/W326E/E339Q
pdb-Code	4HTB	4JBR	3UVI
Datensammlung			
Beamline	BESSY 14.2	BESSY 14.2	BESSY 14.2
Wellenlänge	0.918 41 Å	0.918 41 Å	0.918 41 Å
Raumgruppe	C121	P6 ₅ 22	C121
Zelle			
a	91.0	127.6	91.0
b	64.7	127.6	65.0
c	70.6	116.3	70.5
α	90.0	90.0	90.0
β	95.5	90.0	95.6
γ	90.0	120.0	90.0
Diffraktionsdaten			
Auflösungsbereich	30.0 - 1.90 (1.93 - 1.90)	30.0 - 2.92 (2.97 - 2.92)	50.0 - 1.55 (1.58 - 1.55)
Anzahl der Reflexe	31561 (1565)	12637 (619)	58805 (2729)
R(I) _{sym}	0.102 (0.342)	0.100 (0.441)	0.060 (0.274)
Vollständigkeit	98.1% (99.2%)	100% (100%)	99.0% (89.7%)
Redundanz	2.6 (2.5)	15.0 (16.3)	3.0 (2.2)
I/ σ (I)	9.49 (1.90)	29.74 (6.06)	16.08 (2.78)
Verfeinerung			
Auflösungsbereich	29.1 - 1.90 (1.96 - 1.90)	28.11 - 2.92 (3.15 - 2.92)	35.0 - 1.55 (1.58 - 1.55)
Anzahl der Reflexe	31527 (2676)	12578 (2313)	58746 (2416)
R-Werte:			
R _{free}	0.2137 (0.3072)	0.2455 (0.3459)	0.1907 (0.2830)
R _{work}	0.1799 (0.2488)	0.2031 (0.2433)	0.1647 (0.2292)
Nicht-Wasserstoff-Atome:			
Protein	2853	2782	3029
Wasser	272	121	479
sonstige Liganden	27	5	41
Abweichungen von idealer Geometrie (rmsd):			
Winkel	0.906	0.665	1.054
Bindungen	0.005	0.003	0.006
Ramachandran (Procheck ^[135]):			
favorisiert	98.9%	96.2%	94.7%
erlaubt	0.55%	3.5%	4.7%
toleriert	0.55%	0.3%	0.3%
verboten	0.0%	0.0%	0.3%
mittlere B-Werte:			
Protein	26.55	46.71	15.04
Wasser	35.88	37.11	29.69

Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

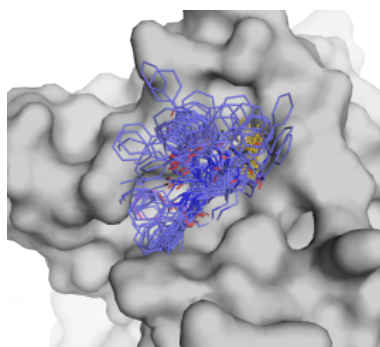
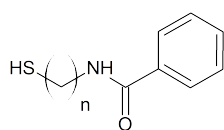
D Geometrische Auswertung der MD-Simulationen verschiedener Tether-Fragmente

n bezeichnet die Anzahl der Methylengruppen im *Tether*-Linker zwischen Disulfid und Amidgruppe zum *Tether*-Substituent. C bezeichnet die Anzahl der zugeordneten Cluster durch *ptraj* für die letzten 10 ns der MD.

SB095

n=4

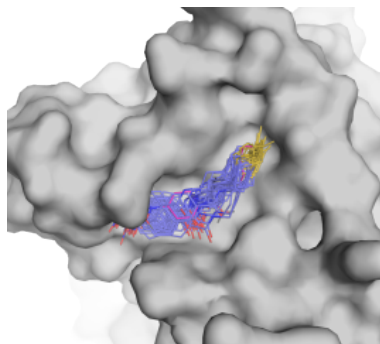
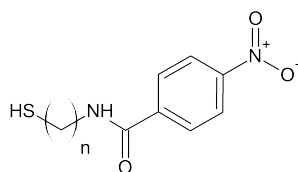
C=14



SB096

n=4

C=5

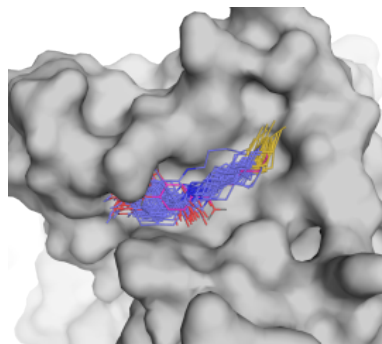
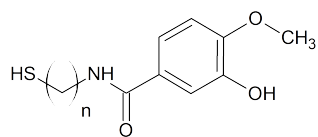


D Geometrische Auswertung der MD-Simulationen verschiedener Tether-Fragmente

SB097

n=4

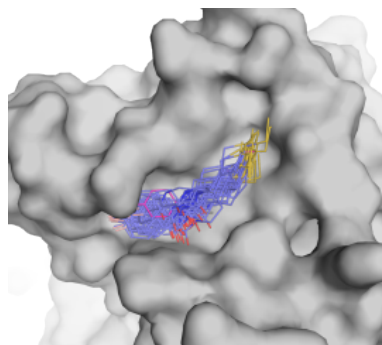
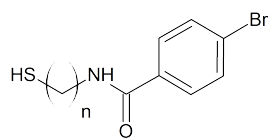
C=1



SB099

n=4

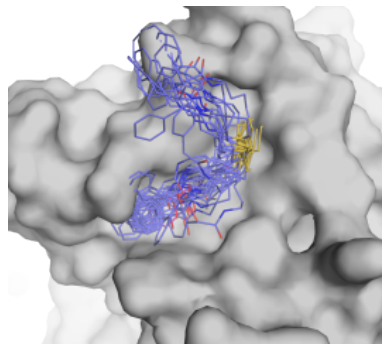
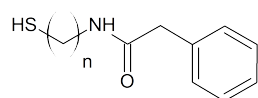
C=3



SB100

n=4

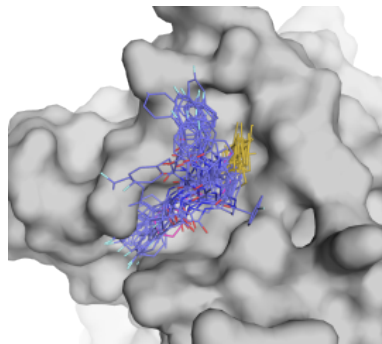
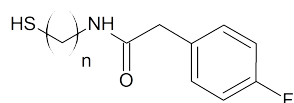
C=21



SB101

n=4

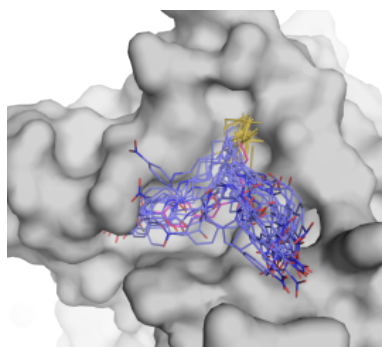
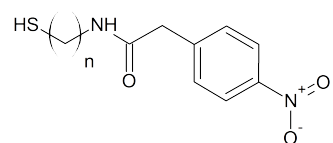
C=15



SB102

n=4

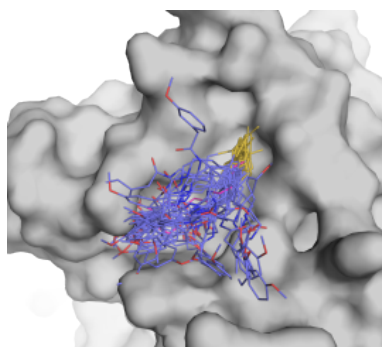
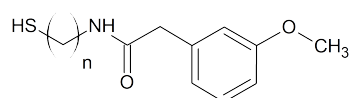
C=30



SB103

n=4

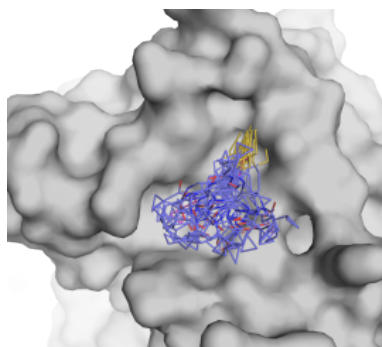
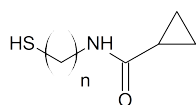
C=36



SB104

n=4

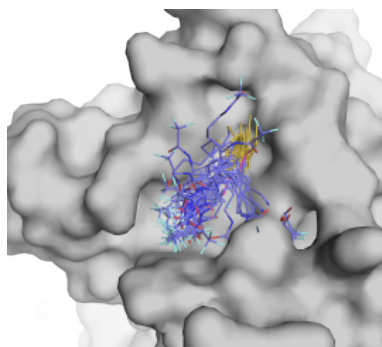
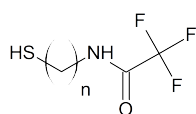
C=14



SB106

n=4

C=23

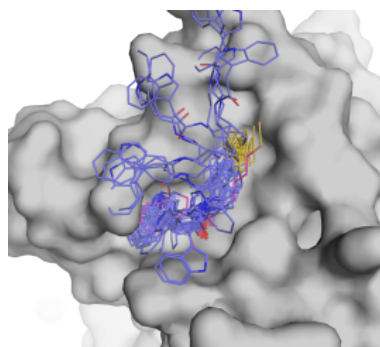
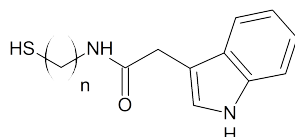


D Geometrische Auswertung der MD-Simulationen verschiedener Tether-Fragmente

SB107

n=4

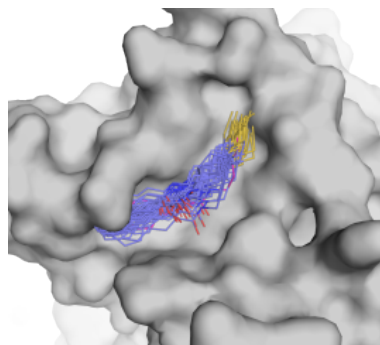
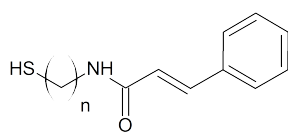
C=33



SB109

n=4

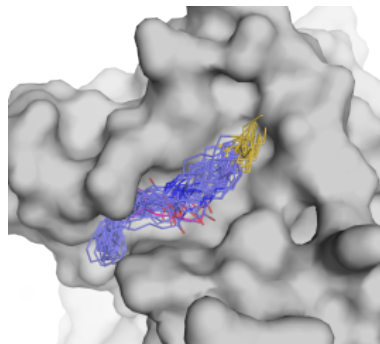
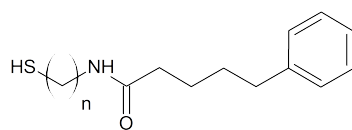
C=4



SB113

n=4

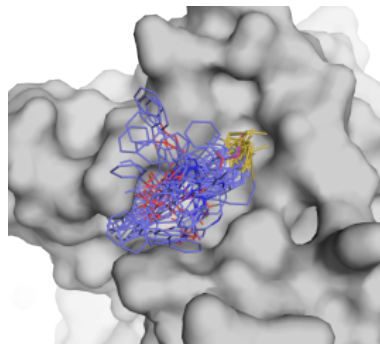
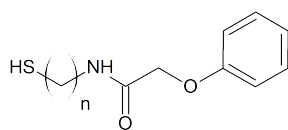
C=10



SB114

n=4

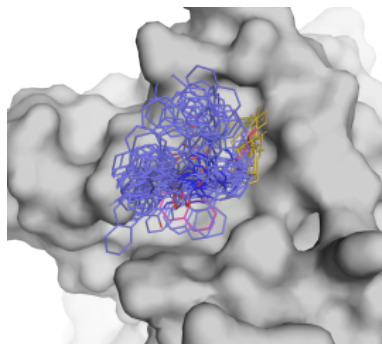
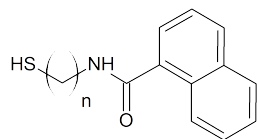
C=23



SB115

n=4

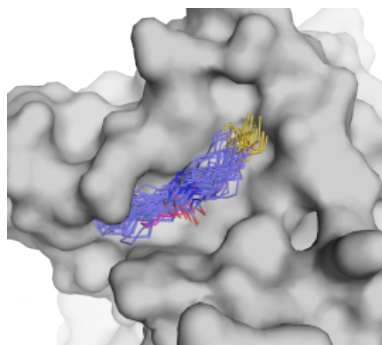
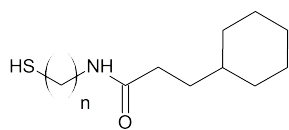
C=6



SB119

n=4

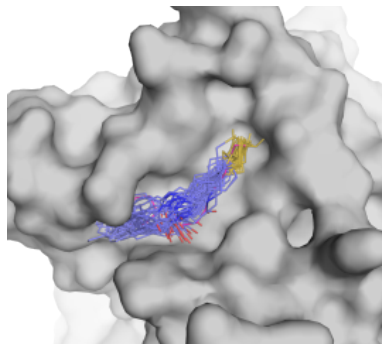
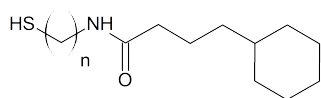
C=9



SB120

n=4

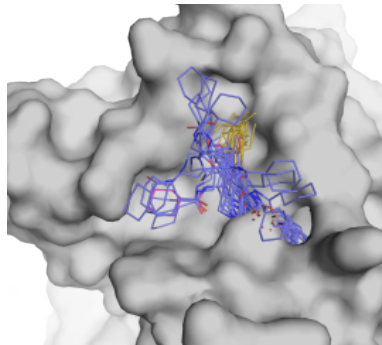
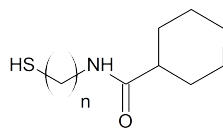
C=8



SB123

n=4

C=4

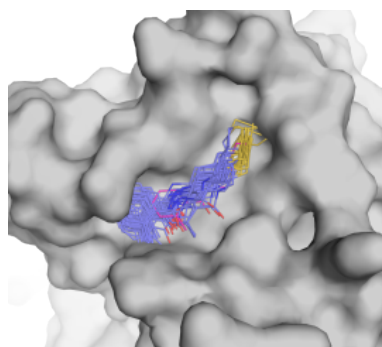
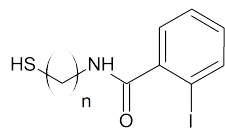


D Geometrische Auswertung der MD-Simulationen verschiedener Tether-Fragmente

SB124

n=4

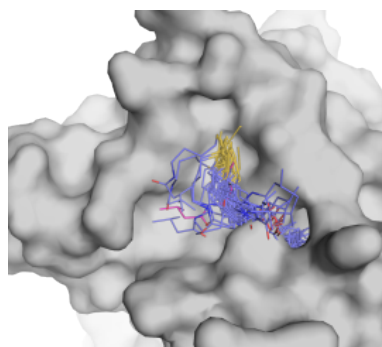
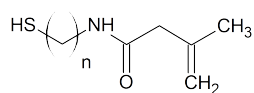
C=1



SB127

n=4

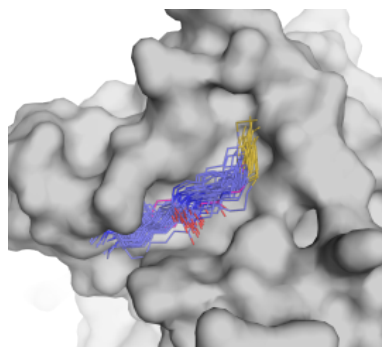
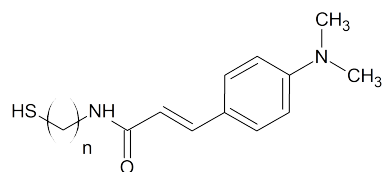
C=4



SB128

n=4

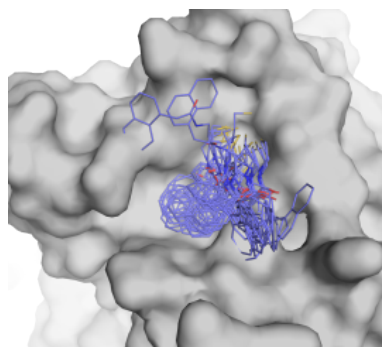
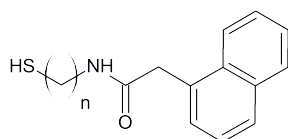
C=3



SB226

n=4

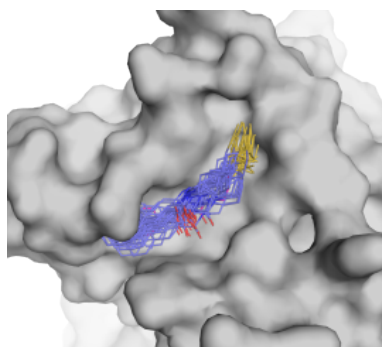
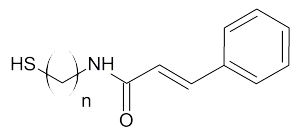
C=8



SB231

n=4

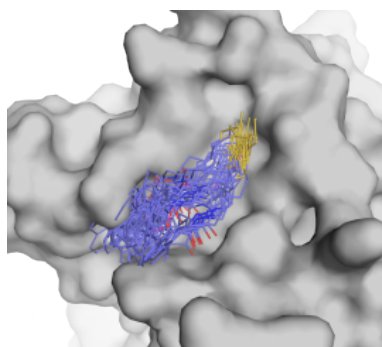
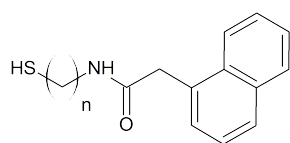
C=4



TK098

n=4

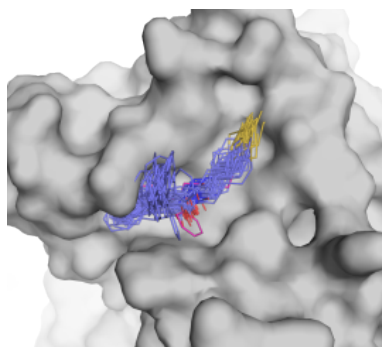
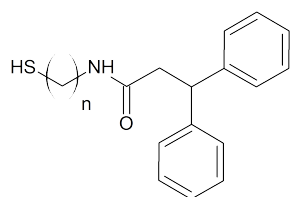
C=12



TK099

n=4

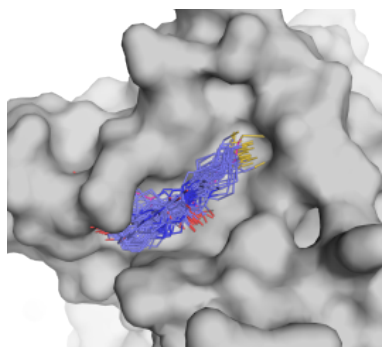
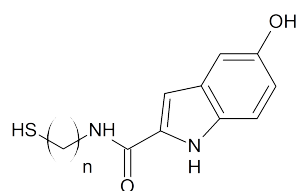
C=4



TK100

n=4

C=3

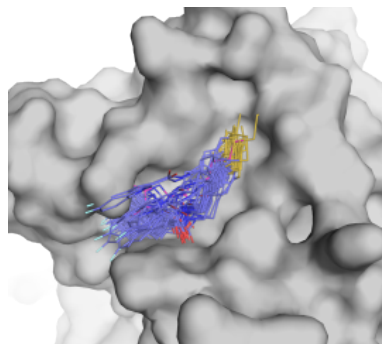
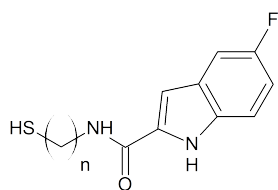


D Geometrische Auswertung der MD-Simulationen verschiedener Tether-Fragmente

TK101

n=4

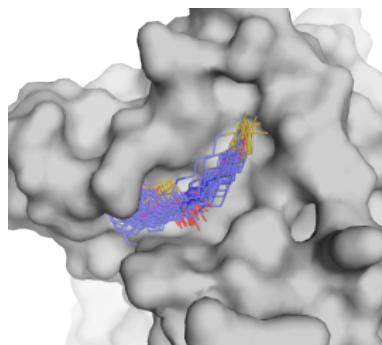
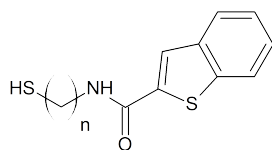
C=5



TK102

n=4

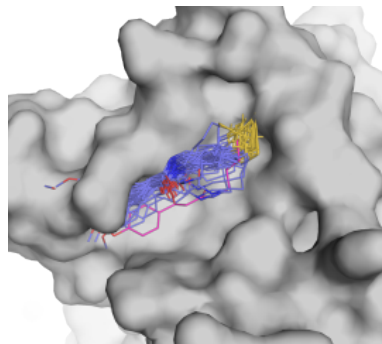
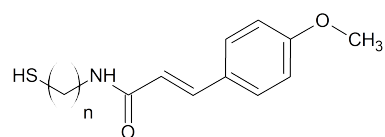
C=2



TK103

n=4

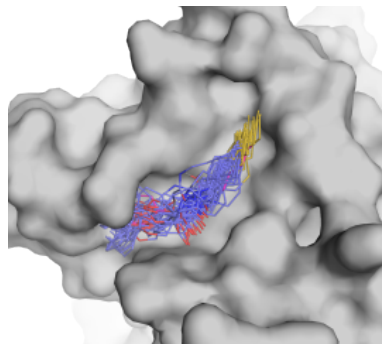
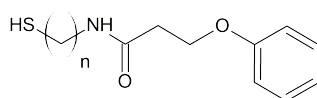
C=5



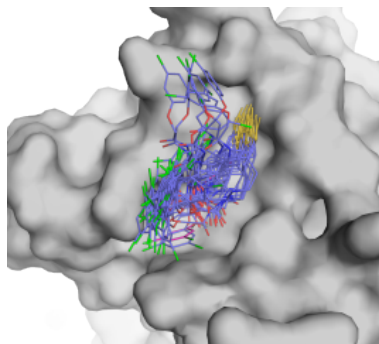
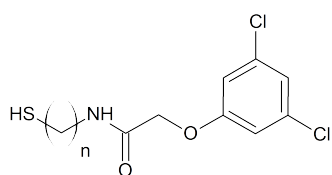
TK104

n=4

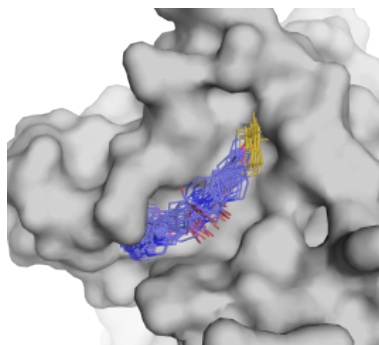
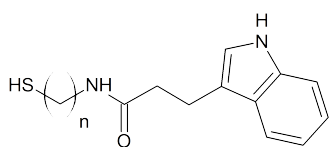
C=7



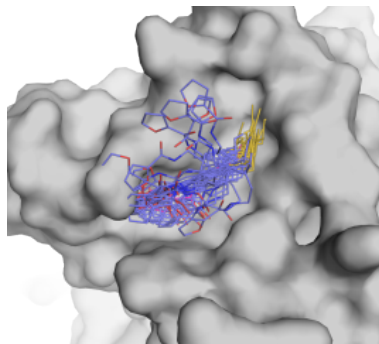
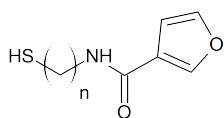
C=18



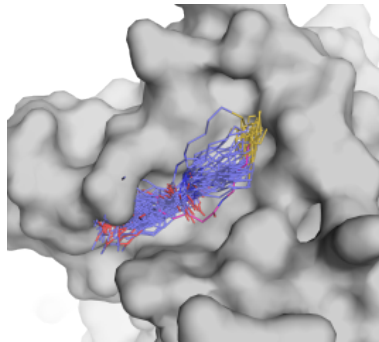
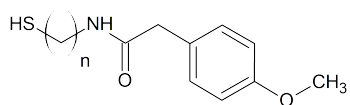
C=6



C=9



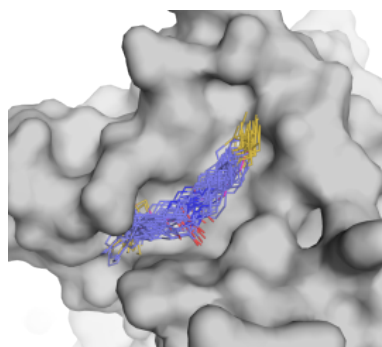
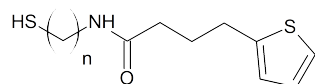
C=5



TK141

n=4

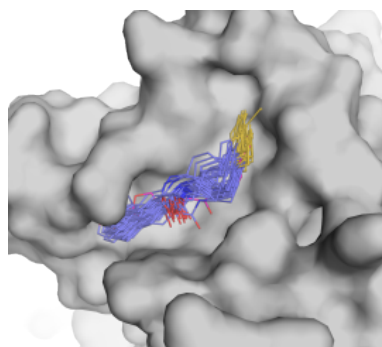
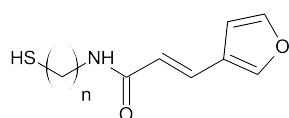
C=11



TK147

n=4

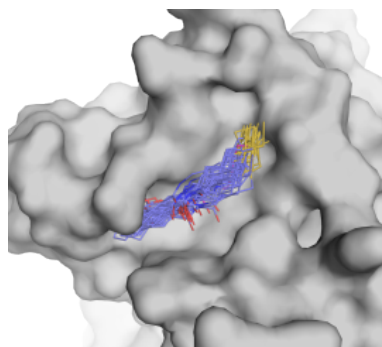
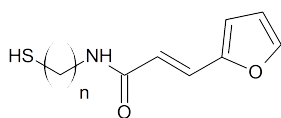
C=1



TK157

n=4

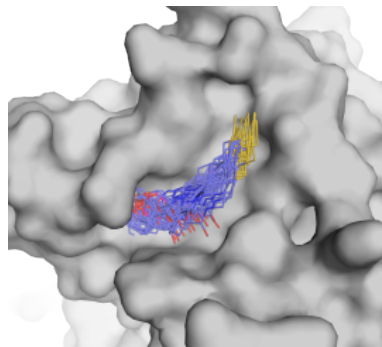
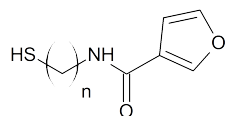
C=3



TK164

n=4

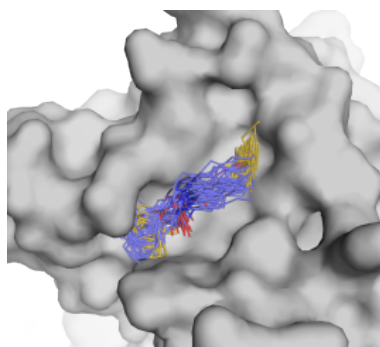
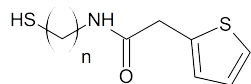
C=3



TK165

n=4

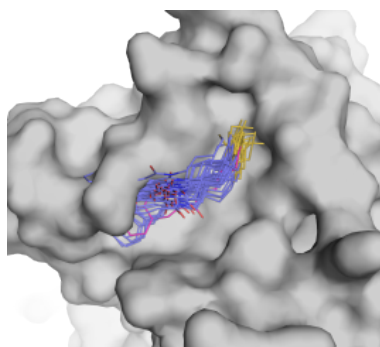
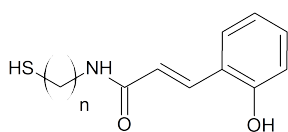
C=5



TK169

n=4

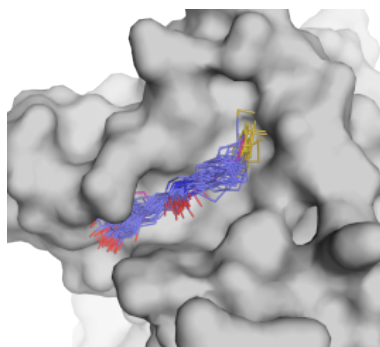
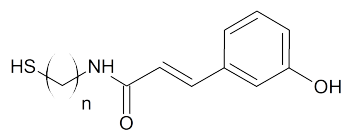
C=2



TK170

n=4

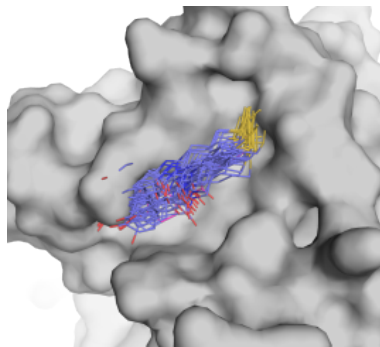
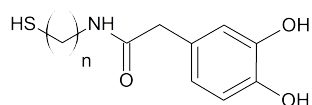
C=2



TK171

n=4

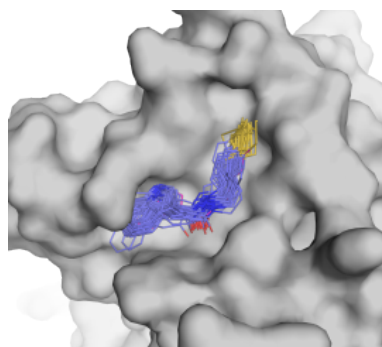
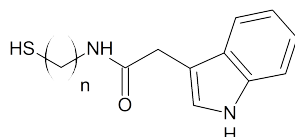
C=4



TK173

n=4

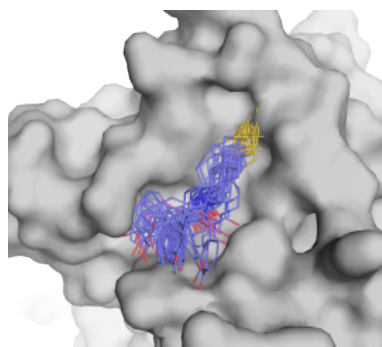
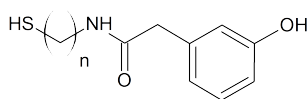
C=2



TK174

n=4

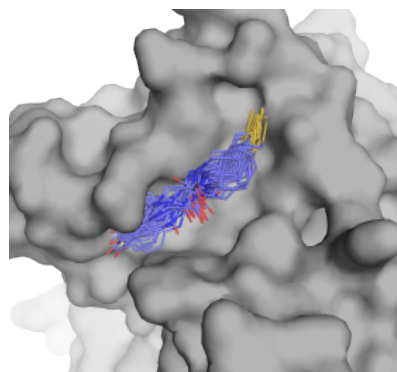
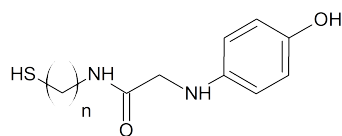
C=6



TK175

n=4

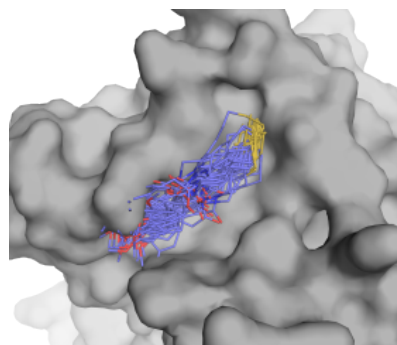
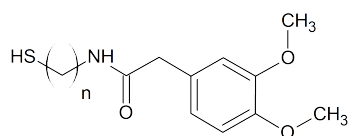
C=4



TK176

n=4

C=6



E Abbildungsverzeichnis

1.1	Invasion des Darmepithels durch <i>S.flexneri</i>	4
1.2	Vergleich eukaryotischer und prokaryotischer TGT-tRNA Komplexe . .	6
3.1	Statistische Auswertung der Wasserstoffbrückenbindungen	32
3.2	Qualitätsparameter der MD Simulation	35
3.3	rmsd von TGT Wildtyp im Verlauf der MD Simulation	36
3.4	Verlaufsanalyse einzelner Wasserstoffbrückenbindungen	38
3.5	Stabilisierungsenergien der Aminosäuren am Wildtyp- <i>Interface</i>	41
3.6	Hot-Spots am Dimer- <i>Interface</i> der TGT	42
3.7	Änderung der Stabilisierungsenergie bei Mutationen	47
3.8	Glu326 nach 20 ns MD Simulation	48
3.9	Vergleich Elution TGT Wildtyp und TGT W326E/E339Q	51
3.10	Aufreinigung von TGT W326E/E339Q über GPC	52
3.11	Testproduktion tet- vs. T7-Induktionssystem	53
3.12	Aufreinigung von TGT über Streptacin Chromatographie	55
3.13	Analytische Größenausschlusschromatographie 1	57
3.14	Analytische Größenausschlusschromatographie 2	59
3.15	Native Massenspektrometrie an TGT W326E/E339Q	60
3.16	Loop-Konformationen 46 bis 52 hinsichtlich der Mutation K52M	62
3.17	Loop-Konformationen 46 bis 52 in TGT K52M - 4DXX	62
3.18	Interaktionen Loop-Konformation A in 4DXX	63
3.19	Interaktionen Loop-Konformation B in 4DXX	63
3.20	Detail Glu326 in TGT C158S/C281S/W326E/E339Q - 3UVI	66
3.21	Detail Trp326 in TGT Wildtyp - 1PUD	66
3.22	Interaktionen Loop in TGT C158S/C281S/W326E/E339Q - 3UVI	67
3.23	Interaktionen Loop in TGT E339Q - 3UNT	68
3.24	Neue Kavität in TGT C158S/C281S/W326E/E339Q - 3UVI	70

3.25	Netzwerk aromatischer Aminosäuren am <i>Interface</i> der TGT	73
3.26	nanoESI-MS: TGT F92C/C158S/C281S, TGT Y330C und TGT Y330D	78
3.27	Detail Cys92 in TGT F92C/C158S/C281S - 4DY1	80
3.28	Interaktionen Loop in TGT 9F2C/C158S/C281S - 4DY1	81
3.29	Neue Zinkbindestelle am <i>Interface</i> in TGT F92C/C158S/C281S - 4DY1	81
3.30	Kristallmorphologien von TGT Y330C – 4HTB vs. 4JBR	83
3.31	Packung von TGT in der Raumgruppe C2 - 1PUD	83
3.32	Packung von TGT Y330C in der Raumgruppe P6 ₅ 22 - 4JBR	84
3.33	Aufgelöster aromatischer Cluster in TGT Y330C - 4HTB	87
3.34	Loop-Konformation 46 bis 52 in TGT Y330C - 4HTB	87
3.35	Disulfidbrücke am <i>Interface</i> von TGT Y330C in P6 ₅ 22 - 4JBR	89
3.36	Gestalt des Dimers in P6 ₅ 22 und C2 im Vergleich	91
3.37	Kavitäten in TGT C158S/C281S/W326E/E339Q - 3UVI und TGT Y330C - 4JBR	93
3.38	Vergleich aller besprochenen Loopkonformationen	97
3.39	Theoretische Anordnung TGT Y330C aus 4JBR in Raumgruppe C2	97
3.40	Vergleich der aromatischen Cluster aller TGT Varianten	100
3.41	Schematische Darstellung des <i>Tetherings</i>	103
3.42	<i>Solvent mapping</i> eines TGT Monomers - 1PUD	107
3.43	Mögliche Positionen für <i>Tethering</i> -Anker	109
3.44	<i>2drmsd-Plots</i> von SB123, SB127, SB107 & TK102	113
3.45	Statistische Auswertung der Fragment-Cluster	115

F Tabellenverzeichnis

2.1	Allgemeiner Algorithmus zum Setup einer MD	12
2.2	Qualität und Bezugsquellen verwendeter Chemikalien	14
2.3	Zusammensetzung verwendeter Puffer, Lösungen und Medien	15
2.4	PCR Bedingungen	17
2.5	Verwendete Primer zur DNA-Mutagenese	18
2.6	Hergestellte Plasmide und zugehörige Wirtszellen	19
2.7	Bedingungen der Klonierung	20
2.8	Eingesetzte Kristallisations- <i>Screens</i>	27
2.9	Reaktionskomponenten der <i>Tethering</i> -Experimente	29
3.1	Energiebeiträge zur Dimerstabilisierung im TGT Wildtyp	40
3.2	Enzymkinetische Parameter hinsichtlich W326E & E339Q	61
3.3	Enzymkinetische Parameter hinsichtlich F92C & Y330X	79
3.4	<i>Interface</i> -Aminosäuren für TGT Y330C in P6 ₅ 22 und C2	86
3.5	Visuelle Auswertung der <i>Tether</i> -Beweglichkeit	112
3.6	HPLC-MS <i>Screen</i> : <i>Tethering</i> an TGT F92C/C158S/C281S	118

G Literaturverzeichnis

- [1] J. WELLS, C. MCCLENDON, Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces, *Nature* **2007**, *450*, 1001.
- [2] G. KLEBE, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag, **2009**.
- [3] D. GRIMME, D. GONZÁLEZ-RUIZ, H. GOHLKE, Computational Strategies and Challenges for Targeting Protein-Protein Interactions with Small Molecules, in J. LUQUE, X. BARRIL (Hg.), *RSC Drug Discovery Series No. 23: Physico-Chemical and Computational Approaches to Drug Discovery*, Royal Society of Chemistry, **2012**, 319.
- [4] T. BERG, Modulation von Protein-Protein-Wechselwirkungen mit niedermolekularen organischen Molekülen, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2566.
- [5] N. J. MARIANAYAGAM, M. SUNDE, J. M. MATTHEWS, The power of two: protein dimerization in biology, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 618.
- [6] M. ARKIN, J. WELLS, Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Progressing towards the Dream, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2004**, *3*, 301.
- [7] S. JONES, J. THORNTON, Principles of protein-protein interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13.
- [8] P. BUCHWALD, Small-Molecule Protein-Protein Interaction Inhibitors: Therapeutic Potential in Light of Molecular Size, Chemical Space, and Ligand Binding Efficiency Considerations, *IUBMB Life* **2010**, *62*, 724.
- [9] G. ZINZALLA, D. THURSTON, Targeting protein-protein interactions for therapeutic intervention: a challenge for the future, *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 65.

- [10] D. FRY, L. VASSILEV, Targeting protein-protein interactions for cancer therapy, *J. Mol. Med.* **2005**, *83*, 955.
- [11] M. ARKIN, Protein-protein interactions and cancer: small molecules going in for the kill, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 315.
- [12] L. BANNWARTH, T. ROSE, L. DUFAU, R. VANDERESSE, J. DUMOND, B. JAMART-GRÉGOIRE, C. PANNECOUQUE, E. DE CLERCQ, M. REBOUD-RAVAUX, Dimer Disruption and Monomer Sequestration by Alkyl Tripeptides are Successful Strategies for Inhibiting Wild-Type and Multidrug-Resistant Mutated HIV-1 Proteases, *Biochemistry* **2009**, *48*, 379.
- [13] L. DE LUCA, M. BARRECA, S. FERRO, F. CHRIST, N. IRACI, R. GITTO, A. MONFORTE, Z. DEBYSER, A. CHIMIRRI, Pharmacophore-Based Discovery of Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein-Interactions between HIV-1 Integrase and Cellular Cofactor LEDGF/p75, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1311.
- [14] A. TÉLLEZ-VALENCIA, V. OLIVARES-ILLANA, A. HERNÁNDEZ-SANTOYO, R. PÉREZ-MONTFORT, M. COSTAS, A. RODRÍGUEZ-ROMERO, F. LÓPEZ-CALAHORRA, M. DE GÓMEZ-PUYOU, A. GÓMEZ-PUYOU, Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an Agent that Perturbs its Dimer Interface, *J. Mol. Biol.* **2004**, *341*, 1355.
- [15] M. WENDT, Protein-Protein Interactions as Drug Targets, in M. WENDT (Hg.), *Topics in Medicinal Chemistry*, **2012**, Bd. 8, 1.
- [16] D. ERLANSON, A. BRAISTED, D. R. RAPHAEL, M. RANDAL, R. M. STROUD, E. M. GORDON, J. A. WELLS, Site-directed ligand discovery, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 9367.
- [17] G. CHESSARI, A. WOODHEAD, From fragment to clinical candidate - a historical perspective, *Drug Discovery Today* **2009**, *14*, 668.
- [18] A. PRETOS, J. DINGES, D. AUGERI, S. BAUMEISTER, D. BETEBENNER, M. BURES, S. ELMORE, P. HAJDUK, M. JOSEPH, S. LANDIS, D. NETTESHEIM, W. ROSENBERG, S.H. SHEN, S. THOMAS, X. WANG, I. ZANZE, H. ZHANG, S. FESIK, Discovery of a Potent Inhibitor of the Antiapoptotic Protein Bcl-xL from NMR and Parallel Synthesis, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 656.

-
- [19] B. CZARNA, A. NA D BECK, S. SRIVASTAVA, G. POPOWICZ, S. WOLF, Y. HUANG, M. BISTA, T. HOLAK, A. DÖMLING, Robust Generation of Lead Compounds for Protein-Protein Interactions by Computational and MCR Chemistry: p53/Hdm2 Antagonists, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5352.
- [20] M. R. ARKIN, M. RANDAL, W. L. DELANO, J. HYDE, T. N. LUONG, J. D. OSLOB, D. R. RAPHAEL, L. TAYLOR, J. WANG, R. S. MCDOWELL, J. A. WELLS, A. C. BRAISTED, Binding of small molecules to an adaptive protein-protein interface, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1603.
- [21] A. ORCAJO-RINCÓN, S. ORTEGA-GUTIÉRREZ, P. SERRANO, I. TORRECILLAS, K. WÜTHRICH, M. CAMPILLO, L. PARDO, A. VISO, B. BENHAMÚ, M. LÓPEZ-RODRÍGUEZ, Development of Non-Peptide Ligands of Growth Factor Receptor-Bound Protein 2-Src Homology 2 Domain Using Molecular Modeling and NMR Spectroscopy, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1096.
- [22] G. KLEBE, Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations, *Drug Discovery Today* **2006**, *11*, 580.
- [23] P. MUKHERJEE, P. DESAI, Y.-D. ZHOU, M. AVERY, Targeting the BH3 Domain Mediated Protein-Protein Interaction of Bcl-xL through Virtual Screening, *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 906.
- [24] C. JOCE, J. STAHL, M. SHRIDHAR, M. HUTCHINSON, L. WATKINS, P. FEDICHEV, H. YIN, Application of a novel in silico high-throughput screen to identify selective inhibitors for protein-protein interactions, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 5411.
- [25] A. KRANJC, S. BONGARZONE, G. ROSSETTI, X. BIARNÉS, A. CAVALLI, M. BOLOGNESI, M. ROBERTI, G. LEGNAME, P. CARLONI, Docking Ligands on Protein Surfaces-. The Case Study of Prion Protein, *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5*, 2565.
- [26] R. BOURGEAS, M.-J. BASSE, X. MORELLI, P. ROCHE, Atomic Analysis of Protein-Protein Interfaces with Known Inhibitors: The 2P2I Database, *PLoS One* **2010**, *5*, 9598.
- [27] A. HIGUERUELO, A. SCHREYER, G. BICKERTON, W. PITT, C. GROOM, T. BLUNDELL, Atomic Interactions and Profile of Small Molecules Disrupting

- Protein-Protein Interfaces: the TIMBAL Database, *Chem. Biol. Drug Des.* **2009**, *74*, 457.
- [28] A. A. BOGAN, K. S. THORN, Anatomy of Hot Spots in Protein Interfaces, *J. Mol. Biol.* **1998**, *280*, 1.
- [29] I. S. MOREIRA, P. A. FERNANDES, M. J. RAMOS, Hot spots - A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2007**, *68*, 803.
- [30] Q. LIU, J. LI, Protein binding hot spots and the residue-residue pairing preference: a water exclusion perspective, *BMC Bioinformatics* **2010**, *11*, 244.
- [31] O. KESKIN, A. GURSOY, B. MA, R. NUSSINOV, Principles of Protein-Protein Interactions: What are the Preferred Ways for Proteins to Interact?, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1225.
- [32] T. CLACKSON, J. A. WELLS, A Hot Spot of Binding Energy in a Hormone-Receptor Interface, *Science* **1995**, *267*, 383.
- [33] D. FILCHTINSKI, O. SHARABI, A. RÜPPEL, I. R. VETTER, C. HERRMANN, J. M. SHIFMAN, What Makes Ras an Efficient Molecular Switch: A Computational, Biophysical, and Structural Study of Ras-GDP Interactions with Mutants of Raf, *J. Mol. Biol.* **2010**, *399*, 422.
- [34] H. GUAN, E. KISS-TOTH, Advanced Technologies for Studies on Protein Interactions, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2008**, *110*, 1.
- [35] A. J. R. HECK, R. H. H. VAN DEN HEUVEL, Investigation of Intact Protein Complexes by Mass Spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* **2004**, *23*, 368.
- [36] M. ABU-FARHA, F. ELISMA, D. FIGEYS, Identification of Protein-Protein Interactions by Mass Spectrometry Coupled Techniques, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2008**, *110*, 67.
- [37] S. SANGIER, C. ATMANENE, G. CHEVREUX, A. VAN DORSSELAER, Non-denaturing Mass Spectrometry to Study Noncovalent Protein/Protein and Protein/Ligand Complexes: Technical Aspects and Application to the Determination of Binding Stoichiometries, in *Methods in Molecular Biology*, vol. 484: *Functional Proteomics: Methods and Protocols*, **2009**, 217.

- [38] A. HANLON, M. LARKIN, R. REDDICK, Free-Solution, Label-Free Protein-Protein Interactions characterized by Dynamic Light Scattering, *Biophys. J.* **2010**, *98*, 297.
- [39] T. RITSCHER, C. ATMANENE, K. REUTER, A. VAN DORSSELAER, S. SANGLER-CIANFERANI, G. KLEBE, An Integrative Approach Combining Noncovalent Mass Spectrometry, Enzyme Kinetics and X-ray Crystallography to Decipher Tgt Protein-Protein and Protein-RNA Interaction, *J. Mol. Biol.* **2009**, *393*, 833.
- [40] J. JANIN, *Protein-Protein Complexes Analysis, Modeling and Drug Design.*, Imperial College Press, **2010**, Kap. X-ray Study of Protein-Protein Complexes and Analysis of Interfaces, 1.
- [41] J. HOSKINS, S. LOVELL, T. BLUNDELL, An algorithm for predicting protein-protein interaction sites: Abnormally exposed amino acid residues and secondary structure elements, *Protein Sci.* **2006**, *15*, 1017.
- [42] L. MEIRELES, A. DÖMLING, C. CAMACHO, ANCHOR: a web server and database for analysis of protein-protein interaction binding pockets for drug discovery, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 407.
- [43] H. GOHLKE, C. KIEL, D. A. CASE, Insights into Protein-Protein Binding by Binding Free Energy Calculation and Free Energy Decomposition for the Ras-Raf and Ras-RalGDS Complexes, *J. Mol. Biol.* **2003**, *330*, 891.
- [44] S. HUO, I. MASSOVA, P. A. KOLLMAN, Computational Alanine Scanning of the 1:1 Human Growth Hormone-Receptor Complex, *J. Comput. Chem.* **2002**, *23*, 15.
- [45] S. LIANG, L. LI, W.-L. HSU, M. N. PILCHER, V. UVERSKY, Y. ZHOU, A. K. DUNKER, S. O. MEROUEH, Exploring the Molecular Design of Protein Interaction Sites with Molecular Dynamics Simulations and Free Energy Calculations, *Biochemistry* **2009**, *48*, 399.
- [46] J. FULLER, N. BURGOYNE, R. JACKSON, Predicting druggable binding sites at the protein-protein interface, *Drug Discovery Today* **2009**, *14*, 155.

- [47] S. ASSI, T. TANAKA, T. RABBITS, N. FERNANDEZ-FUENTES, PCRPi: Presaging Critical Residues in Protein interfaces, a new computational toll to chart hot spots in protein interfaces, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e86.
- [48] D. CARDINALE, O. SALO-AHEN, S. FERRARI, G. PONTERINI, G. CRUCIANI, E. CAROSATI, A. TOCHOWICZ, S. MANGANI, R. WADE, M. COSTI, Homodimeric Enzymes as Drug Targets, *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 826.
- [49] K. L. KOTLOFF, J. P. WINICKOFF, B. IVANOFF, J. D. CLEMENS, D. L. SWERDLOW, P. J. SANSONETTI, G. K. ADAK, M. M. LEVINE, Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies, *Bulletin of the World Health Organization* **1999**, *77*, 651.
- [50] W. H. ORGANIZATION, Vaccine Research and Development - New strategies for accelerating *Shigella* vaccine development, *Weekly Epidemiological Record* **1997**, *72*, 73.
- [51] G. SCHRÖDER, H. HILBI, Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion, *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 134.
- [52] T. ADAM, *Die Invasion von Epithelzellen durch E. coli Shigella*, Dissertation, Medizinische Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin, **2003**.
- [53] T. HALE, Genetic Basis of Virulence in *Shigella* Species, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1991**, *55*, 206.
- [54] C. ROMIER, J. MEYER, D. SUCK, Slight sequence variations of a common fold explain the substrate specificities of tRNA-guanine transglycosylases from the three kingdoms, *FEBS Lett.* **1997**, *416*, 93.
- [55] W. XIE, X. LIU, R. H. HUANG, Chemical trapping and crystal structure of a catalytic tRNA guanine transglycosylase covalent intermediate, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 781.
- [56] B. STENGL, K. REUTER, G. KLEBE, Mechanism and Substrate Specificity of tRNA-Guanine Transglycosylases (TGTs): tRNA-Modifying Enzymes from the Three Different Kingdoms of Life Share a Common Catalytic Mechanism, *Chem-BioChem* **2005**, *6*, 1926.

- [57] U. GRÄDLER, H.-D. GERBER, D. M. GOODENOUGH-LASHUA, G. A. GARCIA, R. FICNER, K. REUTER, M. T. STUBBS, G. KLEBE, A New Target for Shigellosis: Rational Design and Crystallographic Studies of Inhibitors of tRNA-guanine Transglycosylase, *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 455.
- [58] R. BRENK, L. NAERUM, U. GRÄDLER, H.-D. GERBER, G. A. GARCIA, K. REUTER, M. T. STUBBS, G. KLEBE, Virtual Screening for Submicromolar Leads of tRNA-guanine Transglycosylase Based on a New Unexpected Binding Mode Detected by Crystal Structure Analysis, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 1133.
- [59] R. BRENK, E. A. MEYER, K. REUTER, M. T. STUBBS, G. A. GARCIA, F. DIEDERICH, G. KLEBE, Crystallographic Study of Inhibitors of tRNA-guanine Transglycosylase Suggests a New Structure-based Pharmacophore for Virtual Screening, *J. Mol. Biol.* **2004**, *338*, 55.
- [60] B. STENGL, E. A. MEYER, A. HEINE, R. BRENK, F. DIEDERICH, G. KLEBE, Crystal Structures of tRNA-guanine Transglycosylase (TGT) in Complex with Novel and Potent Inhibitors Unravel Pronounced Induced-fit Adaptations and Suggests Dimer Formation Upon Substrate Binding, *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 492.
- [61] T. RITSCHER, P. C. KOHLER, G. NEUDERT, A. HEINE, F. DIEDERICH, G. KLEBE, How to Replace the Residual Solvation Shell of Polar Active Site Residues to Achieve Nanomolar Inhibition of tRNA-Guanine Transglycosylase, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 2012.
- [62] K. REUTER, R. FICNER, Sequence Analysis and Overexpression of the *Zymomonas mobilis tgt* Gene Encoding tRNA-Guanin Transglycosylase: Purification and Biochemical Characterization of the Enzyme, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 5284.
- [63] C. ROMIER, R. FICNER, K. REUTER, D. SUCK, Purification, Crystallization, and Preliminary X-Ray Diffraction Studies of tRNA-Guanin Transglycosylase From *Zymomonas mobilis*, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **1996**, *24*, 516.
- [64] C. ROMIER, K. REUTER, D. SUCK, R. FICNER, Crystal structure of tRNA-guanine transglycosylase: RNA modification by base exchange, *EMBO J.* **1996**, *15*, 2850.

- [65] C. BOLAND, P. HAYES, I. SANTA-MARIA, S. NISHIMURA, V. P. KELLY, Queuosine Formation in Eukaryotic tRNA Occurs via a Mitochondria-localized Heteromeric Transglycosylase, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 18218.
- [66] Y.-C. CHEN, V. P. KELLY, S. V. STACHURA, G. A. GARCIA, Characterization of the human tRNA-guanine transglycosylase: Confirmation of the heterodimeric subunit structure, *RNA* **2010**, *16*, 958.
- [67] I. SCHMIDT, *Untersuchung der Substratspezifität der tRNA-Guanin Transglycosylase und Charakterisierung der katalytischen Untereinheit der eukaryotischen TGT, QTRTD1 und des korrespondierenden Heterodimers*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, **2013**.
- [68] T. RITSCHER, *TGT a Drug Target to Study pKa Shifts, Residual Solvation & Protein - Protein Interface Formation*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, **2009**.
- [69] F. IMMEKUS, *lin - Benzopurines as Inhibitors of tRNA-Guanine Transglycosylase: Perturbance of Homodimer Formation, Import of Water Clusters and Determinants of Crystallographical Disorder*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, **2013**.
- [70] D. CASE, T. DARDEN, T. CHEATHAM, C. SIMMERLING, J. WANG, R. DUKE, R. LUO, R. WALKER, W. ZHANG, K. MERZ, B. ROBERTS, B. WANG, S. HAYIK, A. ROITBERG, G. SEABRA, I. KOLOSSVÁRY, K. WONG, J. PAESANI, J. VANICEK, X. WU, S. BROZELL, T. STEINBRECHER, H. GOHLKE, Q. CAI, X. YE, J. WANG, M.-J. HSIEH, G. CUI, D. ROE, D. MATHEWS, M. SEETIN, C. SAGUI, V. BABIN, T. LUCHKO, S. GUSAROV, A. KOVALENKO, P. KOLLMAN, AMBER 11, University of California, San Francisco, **2010**.
- [71] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2, Schrödinger, LLC.
- [72] Y.-P. PANG, K. XU, J. EL YAZAL, F. G. PRENDERGAST, Successful molecular dynamics simulation of the zinc-bound farnesyltransferase using the cationic dummy atom approach, *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1857.
- [73] Y.-P. PANG, Successful molecular dynamics simulation of two zinc complexes bridged by a hydroxide in phosphotriesterase using the cationic dummy atom method, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2001**, *45*, 183.

- [74] J. WANG, R. WOLF, J. CALDWELL, P. KOLLMAN, D. CASE, Development and testing of a general Amber force field, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1157.
- [75] A. JAKALIAN, B. BUSH, D. JACK, C. BAYLY, Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: I. Method, *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 132.
- [76] A. JAKALIAN, D. JACK, C. BAYLY, Fast efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parametrization and Validation, *J. Comput. Chem.* **2002**, *23*, 1623.
- [77] W. JORGENSEN, J. CHANDRASEKHAR, J. MADURA, M. KLEIN, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926.
- [78] V. HORNAK, R. ABEL, A. OKUR, B. STROCKBINE, A. ROITBERG, C. SIMMERLING, Comparison of Multiple Amber Force Fields and Development of Improved Protein Backbone Parameters, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2006**, *65*, 712.
- [79] T. DARDEN, D. YORK, L. PEDERSEN, Particle mesh Ewald: an $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems., *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 10089.
- [80] J.-P. RYCKAERT, G. CICCOTTI, H. BERENDSEN, Numerical integration of the cartesian equation of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes, *J. Comput. Phys.* **1977**, *23*, 327.
- [81] J. IZAGUIRRE, D. CATARELLO, J. WOZNAK, R. SKEEL, Langevin stabilization of molecular dynamics, *J. Chem. Phys.* **2001**, *114*, 2090.
- [82] J. WEISER, P. SHENKIN, W. STILL, Approximate Atomic Surfaces from Linear Combinations of Pairwise Overlaps (LCPO), *J. Comput. Chem.* **1999**, *20*, 217.
- [83] J. SECO, F. J. LUQUE, X. BARRIL, Binding Site Detection and Druggability Index from First Principles, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2363.
- [84] J. MARTINEZ, L. MARTINEZ, Packing optimization for automated generation of complex system's initial configurations for molecular dynamics and docking, *J. Comput. Chem.* **2002**, *24*, 819.

- [85] L. MARTINEZ, R. ANDRADE, E. BIRGIN, J. MARTINEZ, Packmol: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations, *J. Comput. Chem.* **2009**, *30*, 2157.
- [86] IBA GmbH, *Expression and purification of proteins using Strep-tag and/or 6xHistidine-tag. A comprehensive manual.*, **2011**.
- [87] E. GASTEIGER, C. HOOGLAND, A. GATTKER, S. DUVAUD, M. WILKINS, R. APPEL, A. BAIROCH, Protein Identifikation and Analysis Tool on the ExPASy Server, in J. WALKER (Hg.), *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press, **2005**, 571.
- [88] A. W. CURNOW, F.-L. KUNG, K. A. KOCH, G. A. GARCIA, tRNA-Guanine Transglycosylase from *Escherichia coli*: Gross tRNA Structural Requirements for Recognition, *Biochemistry* **1993**, *32*, 5239.
- [89] U. GRÄDLER, *De Novo-Design und Strukturbestimmung von Inhibitoren der tRNA-Guanin Transglykosylase aus Zymomonas mobilis als neues Target der Bakterienruhr*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, **2000**.
- [90] Z. OTWINOWSKI, W. MINOR, Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode, *Methods in Enzymology* **1997**, *276*, 307.
- [91] A. MCCOY, R. GROSSE-KUNSTLEVE, P. ADAMS, M. WINN, L. STORONI, R. READ, *Phaser* crystallographic software, *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658.
- [92] M. WINN, C. BALLARD, K. COWTAN, E. DODSON, P. EMSLEY, P. EVANS, R. KEEGAN, E. KRISSINEL, A. LESLIE, A. MCCOY, S. MCNICHOLAS, G. MURSHUDOV, N. PANNU, E. POTTERTON, H. POWELL, R. READ, A. VAGIN, K. WILSON, Overview of the CCP4 suite and current developments, *Acta Crystallogr., Sect D: Biol. Crystallogr.* **2011**, *67*, 235.
- [93] P. ADAMS, P. AFONINE, G. BUNKÓCZI, V. CHEN, I. DAVIS, N. ECHOO IS, J. HEADD, L.-W. HUNG, G. KAPRAL, R. GROSSE-KUNSTLEVE, A. MCCOY, N. MORIARTY, R. OEFFNER, R. READ, D. RICHARDSON, J. RICHARDSON, T. TERWILLIGER, P. ZWART, PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution, *Acta Crystallogr., Sect D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 213.

- [94] P. EMSLEY, B. LOHKAM, W. SCOTT, K. COWTAN, Features and development of *Coot*, *Acta Crystallogr., Sect D: Biol. Crystallogr.* **2010**, 66, 486.
- [95] H. BERMAN, J. WESTBROOK, Z. FENG, G. GILLILAND, T. BHAT, H. WEISSIG, I. SHINDYALOV, P. BOURNE, The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 235.
- [96] J. SCHULZE WISCHELER, *Carbonic Anhydrase II: A Model System for Artificial Copper Center Design, Protein-guided Cycloadditions, Tethering Screenings and Fragment-based Lead Discovery*, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, **2010**.
- [97] E. KRISSINEL, K. HENRICK, Inference of macromolecular assemblies from crystalline state, *J. Mol. Biol.* **2007**, 372, 774.
- [98] D. A. PEARLMAN, D. A. CASE, J. CALDWELL, W. S. ROSS, T. CHEATHAM III, S. DEBOLT, D. FERGUSON, G. SEIBEL, P. KOLLMAN, AMBER, a package of computer programs for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to simulate the structural and energetic properties of molecules, *Comput. Phys. Commun.* **1995**, 91, 1.
- [99] D. A. CASE, T. CHEATHAM III, T. DAREN, H. GOHLKE, R. LUO, K. M. MERZ JR., A. ONUFRIEV, C. SIMMERLING, B. WANG, R. J. WOODS, The Amber Biomolecular Simulation Programs, *J. Comput. Chem.* **2005**, 26, 1668.
- [100] A. ONUFRIEV, D. BASHFORD, D. CASE, Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized Born model, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2004**, 55, 383.
- [101] F. IMMEKUS, L. BARANDUN, M. BETZ, F. DEBAENE, S. PETIOT, S. SANGLIER-CIANFERANI, K. REUTER, F. DIEDERICH, G. KLEBE, Launching Spiking Ligands into a Protein-Protein Interface: A Promising Strategy to Destabilize and Break Interface Formation in a tRNA Modifying Enzyme, *submitted*.
- [102] S. PITRE, M. ALAMGIR, J. GREEN, M. DUMONTIER, F. DEHNE, A. GOLSHANI, Computational Methods for Predicting Protein-Protein Interactions, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **2008**, 110, 247.

- [103] I. MASSOVA, P. A. KOLLMAN, Computational Alanine Scanning To Probe Protein-Protein Interactions: A Novel Approach to Evaluate Binding Free Energies, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8133.
- [104] H. GOHLKE, D. A. CASE, Converging Free Energy Estimates: MM-PB(GB)SA Studies on the Protein-Protein Complex Ras-Raf, *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 238.
- [105] P. FLEMING, F. RICHARDS, Protein Packing: Dependence on Protein Size, Secondary Structure and Amino Acid Composition, *J. Mol. Biol.* **2000**, *299*, 487.
- [106] Y. TSUCHIYA, H. NAKAMURA, K. KINOSHITA, Discrimination between biological interfaces and crystal-packing contacts, *Adv. Appl. Bioinform. Chem.* **2008**, *1*, 99.
- [107] S. DASGUPTA, G. IYER, S. BRYANT, C. LAWRENCE, J. BELL, Extent and Nature of Contacts Between Protein Molecules in Crystal Lattices and Between Subunits of Protein Oligomers, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **1997**, *28*, 494.
- [108] H. PONSTINGL, K. HENDRICK, J. THORNTON, Discriminating Between Homodimeric and Monomeric Proteins in the Crystalline State, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2000**, *41*, 47.
- [109] M. AHMED, F. SPYRAKIS, P. COZZINI, P. TRIPATHI, A. MOZZARELLI, J. SCARSDALE, M. SAFO, G. KELLOGG, Bound Water at Protein-Protein Interfaces: Partners, Roles and Hydrophobic Bubbles as a Conserved Motif, *PLoS One* **2011**, *6*, e24712.
- [110] S. BURLEY, G. PETSKE, Aromatic-Aromatic Interaction: A Mechanism of Protein Structure Stabilization, *Science* **1985**, *229*, 23.
- [111] G. MCGAUGHEY, M. GAGNÉ, A. RAPPEÉ, π -Stacking Interactions. Alive and well in Proteins., *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 15458.
- [112] L. ESPINOZA-FONSECA, Aromatic residues link binding and function of intrinsically disordered proteins, *Mol. BioSyst.* **2012**, *8*, 237.
- [113] R. BHATTACHARYYA, U. SAMANTA, P. CHAKRABARTI, Aromatic-aromatic interactions in and around α -helices, *Protein Eng., Des. Sel.* **2002**, *15*, 91.

- [114] K. DILL, K. FIEBIG, H. CHAN, Cooperativity in protein-folding kinetics, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 1942.
- [115] C.-J. TSAI, R. NUSSINOV, Hydrophobic folding units at protein-protein interfaces: Implications to protein folding and to protein-protein association, *Protein Sci.* **1997**, *6*, 1426.
- [116] H. ZHAO, S. NAGANATHAN, D. BECKETT, Thermodynamic and Structural Investigation of Bispecificity in Protein-Protein Interactions, *J. Mol. Biol.* **2009**, *389*, 336.
- [117] I. NOOREN, J. THORNTON, Diversity of protein-protein-interactions, *EMBO J.* **2003**, *22*, 3486.
- [118] N. KANNAN, S. VISHVESHWARA, Identification of side-chain clusters in protein structures by a graph spectral method, *J. Mol. Biol.* **1999**, *292*, 441.
- [119] N. KANNAN, S. VISHVESHWARA, Aromatic clusters: a determinant of thermal stability of thermophilic proteins, *Protein Eng., Des. Sel.* **2000**, *13*, 753.
- [120] N. KRESGE, V. VACQUIR, C. STOUT, Abalone Lysin: The dissolving and evolving sperm protein., *Bioessays* **2001**, *23*, 95.
- [121] I. MOREIRA, J. MARTINS, R. RAMOS, P. A. FERNANDES, M. J. RAMOS, Understanding the importance of the aromatic amino-acid residues as hot-spots, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1834*, 404.
- [122] D. GONZÁLEZ-RUIZ, H. GOHLKE, Targeting Protein-Protein Interactions with Small Molecules: Challenges and Perspectives for Computational Binding Epitope for Computational Binding Epitope Detection and Ligand Finding, *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2607.
- [123] D. A. ERLANSON, J. W. LAM, C. WIESMANN, T. N. LUONG, R. L. SIMMONS, W. L. DELANO, I. C. CHOONG, M. T. BURDETT, W. M. FLANAGAN, D. LEE, E. M. GORDON, T. O'BRIEN, *In situ* assembly of enzyme inhibitors using extended tethering, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 308.
- [124] T. BERG, Use of "Tethering" for Identification of a Small Molecule that Binds to a Dynamic Hot Spot on the Interleukin-2 Surface, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1051.

- [125] J. L. JOHNSON, B. CUSACK, T. F. HUGHES, E. H. MCCULLOUGH, A. FAUQ, P. ROMANOVSKIS, A. F. SPATOLA, T. L. ROSENBERRY, Inhibitors Tethered Near the Acetylcholinesterase Active Site Serve as Molecular Rulers of the Perpheral and Acylation Sites, *J. Biol. Chem.* **2003**, *40*, 38948.
- [126] T. B. FAHR, T. O'BRIEN, P. PHAM, N. D. WAAL, S. BASKARAN, B. C. RAIMUNDO, J. W. LAM, M. M. SOPKO, H. E. PURKEY, M. J. ROMANOWSKI, Tethering identifies fragment that yields potent inhibitors of human caspase-1, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 559.
- [127] D. ERLANSON, R. S. MCDOWELL, M. M. HE, M. RANDAL, R. L. SIMMONS, J. KUNG, A. WAIGHT, S. K. HANSEN, Discovery of a New Phosphotyrosine Mimetic for PTP1B Using Breakaway Tethering, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5602.
- [128] F. TERWESTEN, *Studien zur fragmentbasierten Leitstrukturidentifizierung eines TGT-Interface-Inhibitors*, Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, **2011**.
- [129] H. KÖSTER, T. CRAAN, S. BRASS, C. HERHAUS, M. ZENTGRAF, L. NEUMANN, A. HEINE, G. KLEBE, A Small Nonrule of 3 Compatible Fragment Library Provides High Hit Rate of Endothiapepsin Crystal Structures with Various Fragment Chemotypes, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7784.
- [130] H. SASSMANNSHAUSEN, *A CAII case study with tethered ligands: Docking with water, fail-safe or flawed?*, Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg, **2010**.
- [131] G. NEUDERT, G. KLEBE, fconv: Format conversion, manipulation and feature computation of molecular data, *Bioinformatics* **2011**, *7*, 1021.
- [132] G. NEUDERT, G. KLEBE, DSX: A Knowledge-Based Scoring Function for the Assessment of Protein-Ligand Complexes, *J. Chem. Inf. Model.* **2011**, *51*, 2731.
- [133] H. ALONSO, A. BLIZNYUK, J. GREARY, Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design, *Med. Res. Rev.* **2006**, *26*, 531.
- [134] G. TÓTH, K. MUKHYALA, J. WELLS, Computational Approach to Site-Directed Ligand Discovery, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **2007**, *68*, 551.

- [135] R. LASKOWSKI, M. MACARTHUR, D. MOSS, J. THORNTON, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Cryst.* **1993**, *26*, 283.

Danksagung

Während meiner Arbeit an dieser Dissertationsschrift habe ich von vielen Seiten Hilfe und Unterstützung erfahren. Dafür bedanke ich mich herzlich. Die vergangenen Jahre haben mich fachlich wie persönlich bereichert, ich werde immer gern an diese Zeit zurückdenken und davon zehren. Einigen Personen möchte ich nachfolgend im Besonderen danken.

Professor Dr. *Gerhard Klebe* danke ich für sein Vertrauen, das er in mich gesetzt hat, als er mir das Thema überlassen und mir alle Freiheiten zur Bearbeitung gegeben hat. Die Unterstützung durch das hervorragende Arbeitsumfeld in seinem Arbeitskreis kann ich nicht hoch genug hervorheben. Sein stetiges, wohlwollendes Interesse in Verbindung mit inspirierenden und lenkenden Gesprächen hat meiner Projektarbeit den notwendigen Rückhalt gegeben.

Professor Dr. *Klaus Reuter* danke ich für die Expertise im Bereich des gentechnischen Labors und der umfassenden Einführung in die Thematik rund um die TGT. Für die vertrauensvolle Zusammenarbeit bei allen Belangen betreffend der Tätigkeit im analytisch-chemischen Praktikum sowie die Übernahme des Koreferats der Dissertationsschrift bedanke ich mich.

Professor Dr. *Andreas Heine* danke ich für die Einführung in die Röntgen-Proteinkristallographie und die Zusammenarbeit bei der Strukturaufklärung.

Dr. *Sarah Sanglier-Cianferani* und Dr. *Stéphanie Petiot* vom Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique in Strasbourg danke ich für die Erstellung von nativen Massenspektren zur Untersuchung des TGT Dimers.

Dr. *Uwe Linne* und *Natalia Fritzler* vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg danke ich für die Zusammenarbeit bei der umfangreichen, massenspektrometrischen Charakterisierung beim *Tethering*-Projekt. Ralf Pöschke danke ich für die Durchführung der Kristallisationsscreens.

Meinen Kollegen *Inna Biela*, *Manuel Neeb*, *Felix Terwesten*, *Christian Hasewinkel*, *Jessica Jüngel* und Dr. *Florian Immekus* danke ich für die gemeinsamen Anstrengungen in Sachen TGT. Darüber hinaus bedanke ich mich ganz besonders bei *Inna Biela*, Dr.

Adam Biela, Dr. Ina Lindemann, Dr. Helene Köster, Barbara Wienen und Manuel Neeb, die für mich während der gemeinsamen Zeit in der AG Klebe zu Freunden geworden sind und meine Arbeits stets mit ermunternden und konstruktiv kritischen Anregungen begleitet haben.

Dem Administratoren-Team unserer Arbeitsgruppe um *Sven Siebler, Dr. Gerd Neudert, Felix Guth, Michael Betz, Dennis Schmidt, Timo Krotzky* und *Felix Terwesten* danke ich für die Betreuung der für die Arbeit an diesem Projekt unverzichtbaren IT-Umgebung.

Lydia Hartleben und *Christian Sohn* danke ich für die administrative und technische Unterstützung der Arbeit in der AG Klebe. Allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Prof. Dr. G. Klebe sowie dem Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg danke ich für die gewährte Unterstützung.

Meinen Eltern und meiner ganzen Familie danke ich für die aufmerksame und liebevolle Unterstützung meiner gesamten wissenschaftlichen Ausbildung. Nur durch euch konnte ich all das beginnen, was ich zu einem Abschluss bringen möchte. Ich konnte stets auf eure Hilfe vertrauen. Herzlicher Dank gilt ebenfalls meinen Schwiegereltern.

Diese Dissertation konnte ich nur durch die stetige Unterstützung und den Rückhalt durch meine Frau Maren anfertigen. Die Geburt unseres Sohnes Paul Leonhard prägte auf wunderbare Weise mein Leben neben dieser Arbeit. Deine Kraft und Liebe gaben mir die notwendigen Freiheiten, um das Projekt abzuschließen. In der Zeit des beruflichen Umstiegs hast du mir den Rücken freigehalten und dein unbedingtes Vertrauen in mich und uns bewiesen. Dir gilt mein größter Dank und meiner wachsenden Familie meine besondere Zuneigung und liebevollste Verpflichtung.

Curriculum vitae

Aus Gründen des Persönlichkeitsschutzes wird von der elektronischen Veröffentlichung des Lebenslaufes abgesehen.

Erklärung

(gemäß §5 der Promotionsordnung)

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Nichtkompetitive Inhibition der tRNA-Guanin Transglycosylase durch Störung der essentiellen Protein-Protein-Interaktion“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 5. April 2013

Stephan Jakobi